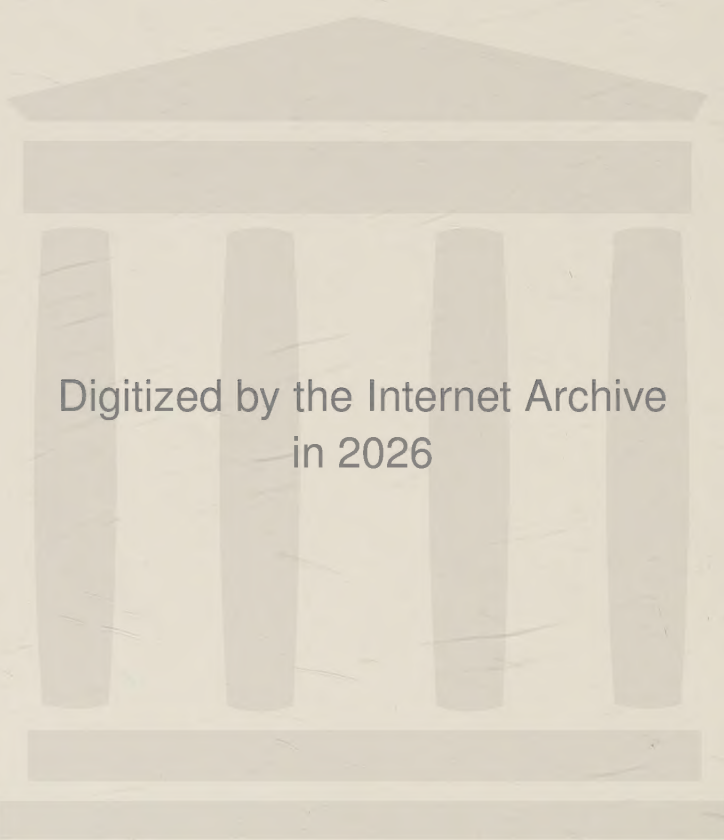


INTERAKTION GAD-
UND DYNORPHIN A-IMMUNREAKTIVER
STRUKTUREN IN DER SUBSTANTIA
NIGRA DER RATTE:
EINE EXPERIMENTELLE,
DOPPELIMMUNCYTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNG

Rainer Riesenberg

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0070

INTERAKTION GAD- UND DYNORPHIN A-IMMUNREAKTIVER STRUKTUREN
IN DER SUBSTANTIA NIGRA DER RATTE:
EINE EXPERIMENTELLE, DOPPELIMMUNCYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Rainer Riesenberg
aus München

Februar 1988

1.Berichterstatter: PD Dr.D.Weiss

2.Berichterstatter: PD Dr.M.Vater

Tag der mündlichen Prüfung: 3.8.1988

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Zur Bedeutung der Substantia nigra	1
1.2.	Gliederung der Substantia nigra bei Säugern	2
1.3.	Efferenzen der Substantia nigra pars compacta	3
1.3.1.	Die dopaminerge nigro-striatale Bahn	3
1.3.2.	Weitere dopaminerge Efferenzen	3
1.4.	Efferenzen der Substantia nigra pars reticulata	4
1.4.1.	Die nigro-thalamischen Projektionen	4
1.4.2.	Die nigro-tectalen Projektionen	4
1.4.3.	Die nigro-tegmentalen Projektionen	5
1.4.4.	Weitere nicht-dopaminerge Efferenzen	5
1.5.	Afferenzen der Substantia nigra	6
1.5.1.	Die striato-nigralen Bahnen	6
1.5.2.	Die pallido-nigrale Bahn	6
1.5.3.	Weitere Afferenzen	7
1.6.	Feinstruktur der Substantia nigra	7
1.6.1.	Neuronentypen	7
1.6.2.	Die synaptische Organisation der Substantia nigra bei Katzen	8
1.6.3.	Die synaptische Organisation der Substantia nigra bei Ratten	8
1.7.	Zuordnung der Transmitterkandidaten mittels Immunocytochemie zu Neuronen- und Boutontypen	9
1.7.1.	GAD- oder GABA-Antikörper ?	9
1.7.2.	Kontakte der GABAergen Boutons an Neuronen in der Substantia nigra	10
1.7.3.	Kombination von Läsionen und Immunocytochemie zur Klärung synaptischer Interaktionen	11
1.7.4.	Dynorphine in der Substantia nigra	12
1.7.5.	Vergleich der Verteilung von GAD und Dynorphin A in Terminalen der Substantia nigra	14
1.8.	Fragestellungen	14

2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1.	Versuchstiere	15
2.2.	Operationen	15
2.2.1.	Kontrollen mit Colchizin	15
2.2.2.	Ibotensäureläsionen	16
2.2.3.	Pränigrale Hemitranssektionen	17
2.3.	Fixierung	17
2.4.	Vibratomschneiden	18
2.5.	Immunhistochemie	18
2.6.	Immunhistochemie an Vibratomschnitten	19
2.6.1.	Die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP)	19
2.6.2.	Die Avidin-Biotin-Methode (ABC)	21
2.6.3.	Immunogold-Methoden	22
2.6.3.1.	Die Streptavidin-Gold-Methode	22
2.6.3.2.	Silberintensivierung	24
2.6.4.	Doppelfärbung mit PAP/DAB und Streptavidin/ Gold	25
2.6.5.	Kontrollen	26
2.7.	Elektronenmikroskopische Aufarbeitung der Vibratomschnitte	28
2.8.	Abbildungen 2 - 3	30
3.	ERGEBNISSE	32
3.1.	GAD-Immuncytochemie an Kontrolltieren	32
3.2.	GABA-Immuncytochemie an unbehandelten Tieren	34
3.3.	GAD-Immuncytochemie nach Ibotensäureläsionen des Striatumkopfes	34
3.4.	GAD-Immuncytochemie nach pränigraler Hemi- transsektion	35
3.5.	GAD-Immuncytochemie mit Streptavidin/Gold und Silberintensivierung an unbehandelten Tieren	36
3.6.	Dynorphin A-Immuncytochemie an unbehandelten Tieren	37

3.7.	Doppel-Immuncytochemie	39
3.7.1.	Doppel-Immuncytochemie mit Dynorphin A/PAP und GAD/Streptavidin-Gold an unbehandelten Tieren	39
3.7.1.1.	Lichtmikroskopischer Nachweis	39
3.7.1.2.	Elektronenmikroskopischer Nachweis	39
3.7.2.	Doppel-Immuncytochemie mit GABA/PAP und GAD/ Streptavidin-Gold an unbehandelten Tieren	40
3.8.	Abbildungen und Legenden 4 - 14	42
4.	DISKUSSION	64
4.1.	Colchizin	64
4.2.	Ibotensäure	65
4.3.	Spezifität der immuncytochemischen Methode	66
4.3.1.	Fixierung	66
4.3.2.	Präinkubierung	68
4.4.	Serumspezifität	70
4.4.1.	Was macht Antikörper selektiv ?	71
4.4.2.	Kreuzreaktionen	71
4.4.3.	Einfluß der Verdünnung des primären Antiserums	72
4.4.3.1.	Kontaminierende Antikörper	72
4.4.3.2.	Bigbee-Effekt bei der indirekten PAP-Methode	72
4.4.4.	Komplementbindung	73
4.4.5.	Verwendung von Fab-Fragmenten	73
4.5.	Spezifikationstests am Gewebeschnitt	74
4.5.1.	Spezifitätskontrollen	74
4.5.2.	Negativkontrolle	75
4.5.3.	Präimmuntest	75
4.6.	Zur Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen	76
4.7.	Degeneration neuronaler Zellstrukturen	76
4.8.	GABAerge Neurone in der Substantia nigra	77
4.9.	Läsionsexperimente	77
4.10.	Die dynorphinerge striato-nigrale Projektion	80

4.11.	Interaktionen von Dynorphin A und GABA im striato-nigralen System	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG	88
6.	ANHANG	90
6.1.	Postembedding-Verfahren für immunocytochemische Markierung von Transmitterkandidaten	90
6.2.	Häufig verwendete Abkürzungen	93
7.	LITERATURVERZEICHNIS	94

1. EINLEITUNG

1.1. Zur Bedeutung der Substantia nigra

Die Substantia nigra (SN) im ventralen Mittelhirn wurde erstmals 1786 von F.Vicq d'Azyr beschrieben und wenige Jahre später von S.T.von Soemmerring (1791) als SN benannt. Sie zählt neben anderen Kerngebieten des Mesencephalon, Diencephalon und Telencephalon zum extrapyramidalen System. Die Funktion der eisenhaltigen SN, deren größere Zellen bei Primaten durch Melanin pigmentiert sind, blieb lange Zeit unbekannt. C.und O.Vogt (1920) sahen in einem "Status desintegrationis" die pathologisch-anatomische Grundlage der Parkinsonschen Krankheit, die 1817 durch den englischen Arzt James Parkinson beschrieben worden war. Die von C.und O.Vogt stammenden Serienschnitte zahlreicher SN von Patienten mit bekannten Krankengeschichten wurden von R.Hassler (1938) detailliert bearbeitet und die pathologischen Veränderungen - mit den charakteristischen Zelldegenerationen - als morphologische Grundlage des Parkinsonsyndroms gedeutet. Zahlreiche Tierexperimente in den folgenden Jahren zeigten, daß die Verbindungen der SN mit den anderen Kerngebieten wesentlich komplizierter waren als zunächst angenommen werden konnte.

Wie die Basalganglien erreicht auch die SN über descendierende Neuronenketten das Spinalmark und hat, vermutlich über verschiedene Regelkreise und Verbindungen mit anderen Kerngebieten des extrapyramidalen Systems, kontrollierenden und regulierenden Einfluß auf Aktivitäten, die von motorischen und prämotorischen Rindenfeldern ausgehen, so daß die Willkürbewegungen reibungslos und glatt ausgeführt werden können. Im Vergleich zu den Basalganglien von Vögeln und Reptilien (Sauropsiden), deren Haupteinfluß auf die motorischen Funktionen über Prätectum und Tectum verläuft, üben die Säugerbasalganglien hauptsächlich Einfluß über den Tha-

lamus auf den motorischen Cortex aus. Bis in die späten 1960er Jahre galt die Meinung, daß die Telencephali bei Sauropsiden von ihren Basalganglien, bei Säugern vom Neocortex dominiert würden. Nach Untersuchungen der letzten 20 Jahre sind vor allem das Striatum und die striato-"nigrale" Projektion dieser Vertebratenklassen in Anlage, Afferenzen und Efferenzen sowie transmitterspezifischen neuronalen Subpopulationen vergleichbar (Reiner et al., 1984).

Das experimentelle Interesse an der SN erfuhr eine Belebung durch die Entdeckung des hohen Dopamingehaltes in neuronalen Elementen der SN und der starken Reduzierung beim Parkinsonsyndrom (Ehringer und Hornykiewicz, 1960; Hornykiewicz, 1963); sowie durch den Nachweis der dopaminergen nigro-striatalen Bahn (Anden et al., 1964).

1.2. Gliederung der Substantia nigra bei Säugern

Das Kerngebiet der SN in caudo-rostraler Lage zwischen Crus cerebri (ventral), Lemniscus medialis (dorsal) und Area tegmentalis ventralis (medial) kann in drei Teile untergliedert werden: Substantia nigra pars compacta (SNc), pars reticulata (SNr) und pars lateralis (SNl). Das dichte Neuropil der SNr besteht aus einem Netzwerk von Dendriten und dünnen Fasern, die sich in longitudinaler und dorso-ventraler Richtung ausbreiten. Das Netzwerk wird unterbrochen durch große Faserbündel der Crus cerebri und Zellkörper unterschiedlicher Größe. Im Gegensatz dazu ist die SNc eine dünne Schicht aus dicht gepackten, überwiegend mittelgroßen Zellkörpern. Sie liegt dorsal über der SNr. Rostral ist sie schwächer ausgeprägt. Die SNl befindet sich dorso-lateral zur SNc und enthält vor allem mittelgroße Zellkörper.

1.3. Efferenzen der Substantia nigra pars compacta

1.3.1. Die dopaminerge nigro-striatale Bahn

Diese Projektion, mit ihrem Ursprung in der SNc, ist primär ipsilateral angelegt. Sie hat einen geringen contralateralen Anteil (Fass and Butcher, 1981; Loughlin and Fallon, 1982) durch Kollateralen hauptsächlich unilateraler Projektionsneurone (Loughlin and Fallon, 1982; Pritzel et al., 1983). Die ipsilaterale Bahn ist zu 95% dopaminerg (van der Kooy et al., 1981) und entsteht aus zwei Arten von Neuronen: Die eine bildet Fasern ohne lokale Kollateralen, während die andere Art lokale Kollateralen zur SNc, SNr und retrorubralem Feld abzweigt (Preston et al., 1981). Die Axone der dopaminergen Neurone sind dünn und nicht myelinisiert und haben oft kleine, regelmäßig angeordnete Verdickungen (Lindvall et al., 1974). Der synaptische Effekt von Dopamin im Striatum (excitatorisch oder inhibitorisch) ist ungeklärt. Auch bei Sauropsiden wurden Katecholamin-haltige, überwiegend dopaminerge Terminale im Striatum nachgewiesen, die auf "nigrale" tegmentale Zellgruppen zurückzuführen sind (Reiner et al., 1984).

1.3.2. Weitere dopaminerge Efferenzen

Neben dieser "klassischen" Projektion mit einem geringen nicht-dopaminergen Anteil (ca. 5%) gibt es größere und kleinere efferente, dopaminerge Faserverbindungen der SNc, deren wichtigste die nigro-corticalen Projektionen und die deszendierenden nigro-tegmentalen Fasern sind. Projektionen zum dorsalen Raphekern komplettieren dabei eine Schleife vom Serotonin-haltigen dorsalen Raphekern zur Dopamin-haltigen SNc (Graybiel and Ragsdale, 1979).



1.4. Efferenzen der Substantia nigra pars reticulata

Die meisten Neurone in der SNr benutzen den inhibitorischen Transmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA). Elektrophysiologische Untersuchungen und Verhaltensexperimente (Scheel-Krüger et al., 1977; Ueki et al., 1977; Chevalier et al., 1981) konnten das ebenso zeigen wie immunocytochemische Markierungen mit Antikörpern gegen das GABA synthetisierende Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) (Oertel et al., 1982b; Mugnaini and Oertel, 1985). Viele der GABAergen SNr-Neurone sind sehr wahrscheinlich Projektionsneurone mit Verbindungen zum Thalamus, Colliculus superior und Formatio reticularis (Anderson and Yoshida, 1977; Deniau et al., 1978; Faull and Mehler, 1978; DiChiara et al., 1979; Chevalier et al., 1981).

1.4.1. Die nigro-thalamischen Projektionen

Nigro-thalamische Projektionen entstehen aus großen (20-25 µm) GABAergen, multipolaren Zellen der rostralateralen und zentralen SNr (Clavier et al., 1976; Faull and Mehler, 1978). Die Projektionsneurone bilden lokale Kollaterale zur SNr, SNc und der benachbarten Formatio reticularis medialis (Grofova et al., 1982b). Viele Axone verlaufen dorsal und rostral zum Thalamus und innervieren topografisch den Nc.ventromedialis (Faull and Mehler, 1978). Diese und weitere Faserverbindungen zu verschiedenen Thalamuskernen sind bilateral angelegt (Gerfen et al., 1982).

1.4.2. Die nigro-tectalen Projektionen

Diese Verbindungen bestehen zwischen mittelgroßen Zellen im ventromedialen (rostralen) und ventrolateralen (cauda-

len) Teil der SNr (Faull and Mehler, 1978; Grofova et al., 1982a; Kilpatrick et al., 1982) und dem Colliculus superior beider Hirnhälften (Gerfen et al., 1982). Nigro-tectale Axone sind dünn und unmyelinisiert und bilden symmetrische Synapsen im Colliculus superior mit GABA als inhibitorischem Transmitter (Chevalier et al., 1981; Kilpatrick et al., 1982). Die Axone zahlreicher GABAerger Neurone der SNr (Ribak, 1981; Oertel et al., 1982b; Nagai et al., 1983) haben Kollateralen, die sowohl den Thalamus als auch den Colliculus superior innervieren (Anderson and Yoshida, 1977; Bentioglio et al., 1979; Steindler and Deniau, 1980).

1.4.3. Die nigro-tegmentalen Projektionen

Die nigro-tegmentalen Projektionen der SNr innervieren Kerngebiete der Formatio reticularis (Hopkins and Niesen, 1976; Simon et al., 1979a; Swanson, 1982; Gerfen et al., 1982). Die Projektion zum Nc.tegmentalis pedunculopontinus ist eine Einflußmöglichkeit des extrapyramidalen motorischen Systems auf reticulospinale Neurone, die das Rückenmark innervieren (Graybiel and Ragsdale, 1979). Die Anwesenheit von GABA als möglicher Transmitter in der nigro-tegmentalen Bahn ist noch nicht geklärt (Childs and Gale, 1981; Kilpatrick and Starr, 1981).

1.4.4. Weitere nicht-dopaminerge Efferenzen

Weitere nicht-dopaminerge Efferenzen der SN projizieren zum dorsalen und ventralen Nc.tegmentalis, Nc.interpositus, Cortex und lateralen Kern des Cerebellums und zum Nc.habenulae lateralis und medialis (Simon et al., 1979b; Philipson and Pycock, 1982).

1.5. Afferenzen der Substantia nigra

1.5.1. Die striato-nigralen Bahnen

Von den wichtigen afferenten Systemen der SN sind die striatonigralen Projektionen am besten untersucht (Rosegay, 1944; Johnson and Clementi, 1959). Die erstmals 1971 beschriebene GABAerge inhibitorische Afferenz (Kim et al., 1971; Precht and Yoshida, 1971) entsteht aus mittelgroßen Zellen überall im Caudatum/Putamen (Grofova 1975; Fonnum et al., 1978; Jessel et al., 1978; Staines et al., 1980; Bolam et al., 1981), während die Substanz P-haltige, excitatorische Projektion auf Zellen im rostralen Caudatum/Putamen sowie auf Zellen in der Umgebung des Pallidum zurückzuführen ist (Brownstein et al., 1976; Gale et al., 1977; Hong et al., 1977; Cuellar and Kanazawa, 1978; Ljungdahl et al., 1978a,b; Nagy et al., 1978a). Die axonalen Terminalen dieser Fasern bilden symmetrische, axosomatische und axodendritische Synapsen (GABA) sowie asymmetrische, axospinöse Synapsen (SP) in der SNr (Somogyi and Smith, 1979; de Montis et al., 1981). Die SNr enthält die höchsten Konzentrationen an GABA (Fahn and Cote, 1968) und Substanz P (Brownstein et al., 1976) im Säugerhirn. Eine weitere striatonigrale Verbindung enthält Dynorphin (Vincent et al., 1982a; Fallon et al., 1985). Auch bei Sauropsiden sind GABAerge, SP-haltige und dynorphinerge striatonigrale Projektionsneurone bekannt (Reiner et al., 1984).

1.5.2. Die pallido-nigrale Bahn

Die pallido-nigrale Verbindung (Johnson and Clementi, 1959; Kanazawa et al., 1977; Gerfen et al., 1982) mit Terminalen in der dorsalen SNr und SNc (Ribak et al., 1976; Kanazawa et al., 1977; Gerfen et al., 1982) ist wahrscheinlich GABAerg (Ribak et al., 1980).

1.5.3. Weitere Afferenzen

Weitere Afferenzen sind subthalamo-nigrale und cortico-nigrale (Nitsch et al., 1984) Verbindungen mit Terminalen in der SNr; Projektionen von der Amygdala, Nc.tegmentalis pedunculopontinus, Hypothalamus und die serotonerge Bahn des dorsalen Raphekerns (Gerfen et al., 1982).

1.6. Feinstruktur der Substantia nigra

Untersuchungen der SN an unbehandelten Mäusen (Bak, 1967), Katzen (Rinvik and Grofova, 1970), Ratten (Hajdu et al., 1973) und Affen (Schwyn and Fox, 1973) brachten umfangreiche Erkenntnisse über die Feinstruktur der drei Regionen SNc, SNr und SNl. In der weiteren Besprechung wird vor allem auf die Befunde von Katzen und Ratten eingegangen, da diese beiden Species am gründlichsten studiert worden sind.

1.6.1. Neuronentypen

Nervenzellen der SNc und SNr sind dreieckig oder spindelförmig und im Durchmesser bei Katzen 15-50 μm (Rinvik and Grofova, 1970), bei Affen 15-90 μm (Schwyn and Fox, 1973) und bei Ratten 10-45 μm groß (Danner and Pfister, 1982). Bei Ratten wurden bis zu sieben Subtypen beschrieben (Danner and Pfister, 1982). Kleinere Neurone der Ratten-SN (10-15 μm im Durchmesser) sind hauptsächlich nicht-dopaminerg, während die größeren Zellen in der SNc, rostralen SNr und SNl (15-45 μm) überwiegend Dopamin enthalten und bei Primaten zwischen den Nisslkörpern Pigmentgranula aufweisen. Kleine Neurone mit kurzen Axonen sind möglicherweise inhibitorische Interneurone (Schwyn and Fox, 1973).

1.6.2. Die synaptische Organisation der Substantia nigra bei Katzen

Die Dendriten der Zellen in der SNr und in der caudalen SNc orientieren sich in erster Linie in rostro-caudaler Richtung; die der meisten Zellen in der SNc haben eine dorso-ventrale Orientierung. So kommt es in der SNr zu ausgedehnten Überlappungen dendritischer Felder von Zellen in der SNc und SNr (Rinvik and Grofova, 1970). Die Oberfläche der nigralen Dendriten ist bedeckt mit Boutons, deren Anzahl mit der Distanz vom Soma zunimmt.

Bei der Katze wurden drei Boutontypen unterschieden (Rinvik and Grofova, 1970). Typ I, mit 90% aller Boutons, ist vermutlich striatalen Ursprungs, enthält pleomorphe Vesikel und bildet symmetrische Synapsen mit nigralen Zellkörpern, Dendriten und Spines. Typ II-Boutons (ca. 10%) enthalten runde Vesikel und bilden asymmetrische Synapsen mit nigralen Zellkörpern und Dendriten. Ihre Somata liegen nicht in der SN. Die Boutons des Typ III (ca. 2%) mit pleomorphen Vesikeln bilden "en passant" symmetrische Kontakte mit Dendriten. Alle Boutons in der Katzen-SN enthalten mehrere große (70-120 nm) dense core Vesikel. Wenige axo-axonische Kontakte wurden zwischen Typ II- und Typ III-Boutons gefunden.

1.6.3. Die synaptische Organisation der Substantia nigra bei Ratten

Hajdu et al. (1973) unterschieden sechs verschiedene Boutontypen in der Ratten-SN:

1. Boutons mit pleomorphen Vesikeln und symmetrischen Kontakten (40% aller Boutons). Nach großen, unilateralen Striatumläsionen wurden fast ausschließlich degenerierte Boutons dieses Typs in der ipsilateralen SN gefunden. Damit sind Boutons des Typ I vermutlich die Terminalen der stria-

to-nigralen Projektion.

2. Boutons mit länglichen Vesikeln (10%) und symmetrischen Kontakten.

3. Boutons mit kleinen, runden Vesikeln (10%) und asymmetrischen Kontakten sind vermutlich die Terminalen der cortico-nigralen Bahn.

4. Boutons mit großen, runden Vesikeln (20%) und asymmetrischen Kontakten sind nicht-striatalen Ursprungs.

5. "Clear-terminal"-Boutons (15%) mit symmetrischen und asymmetrischen Kontakten.

6. Boutons mit vielen dichten core Vesikeln (ca. 5%) sind vermutlich dopaminerge Terminale ohne synaptische Spezialisierung, wahrscheinlich Axonkollaterale, die sofort nach Verlassen des nigralen Perikaryons abzweigen. Zu diesem Typ gehören vermutlich auch serotonerge Boutons.

Bei den präsynaptischen Anteilen der dendro-dendritischen Kontakte sowie dem kleineren der beiden Neuronentypen handelt es sich vermutlich um nigrale Interneurone (Hajdu et al., 1973). Dendro-dendritische Synapsen tragen möglicherweise zur postulierten Selbstinhibition dopaminergere Neurone bei (Groves et al., 1975).

1.7. Zuordnung der Transmitterkandidaten mittels Immunocytochemie zu Neuronen- und Boutontypen

1.7.1. GAD- oder GABA-Antikörper ?

Die Aminosäure Gamma-Aminobuttersäure (GABA) ist ein hemmender Neurotransmitter im ZNS. Seine inhibitorische Wirkung wird durch GABA-Rezeptoren an postsynaptischen Zellen vermittelt. Man kann GABAerge Neurone auf zwei Wegen immunocytochemisch identifizieren: Mit Hilfe von Antikörpern gegen das GABA synthetisierende Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) oder gegen GABA selbst. Die Interpretation und der Vergleich beider Methoden kann zu Schwierigkeiten führen:

Die Konzentration von Enzym und Aminosäure ist in den verschiedenen Zellbestandteilen unterschiedlich hoch. Mugnaini und Oertel (1985) nehmen an, daß das von ihnen verwendete GAD-Antiserum ein Antigen erkennt, das sowohl GAD- als auch Cysteinsulfinsäure-Decarboxylase II (CSD II) - Aktivität besitzt. Es könnten also neuronale Elemente markiert werden, die kein GABA enthalten. Nach neueren Untersuchungen (Legay et al., 1987b) scheint es sich bei GAD und CSD II um das gleiche Enzym zu handeln, während CSD I das biosynthetische Enzym für Taurin darstellt. Es gibt Hinweise auf CSD I und Taurin in Terminalen der SN (Legay et al., 1987a). GAD reagiert empfindlich auf Veränderungen der Fixierung und Inkubationsbedingungen und ist in Zellkörpern oft nur nach Blockierung des axonalen Transports mit Colchizin nachzuweisen (zusammengefaßt von Hodgson et al., 1985). Der Vergleich von GAD- und GABA-Immuncytochemie zur Lokalisierung GABAerger Neurone zeigte jedoch gute Übereinstimmung in Verteilung und Typ der markierten Neurone und Nervenendigungen (Somogyi et al., 1985).

1.7.2. Kontakte der GABAergen Boutons an Neuronen in der Substantia nigra

Doppelimmuncytochemische Markierungen in der SN mit Antikörpern gegen GAD und Tyrosinhydroxylase (TH) - als Marker für dopaminerge Neurone - zeigten, daß GAD-immunoreaktive "punctate profiles" (das lichtmikroskopische Korrelat der immunoreaktiven synaptischen Boutons) nicht nur in Kontakt mit Dendriten der dopaminergen SNc-Neurone vorkommen, sondern ebenfalls die Dendriten und Somata der SNr-Neurone umgeben (Oertel et al., 1982a). Reizungen im Striatum hatten eine Hemmung der SNr-Neurone zur Folge (Yoshida and Precht, 1971), ein Effekt, der durch Picrotoxin, ein GABA-Antagonist, blockiert (Precht and Yoshida, 1971) und durch GABA-Mikroiontophorese in der SNr reproduziert werden kann-

te (Feltz, 1971).

1.7.3. Kombination von Läsionen und Immunocytochemie zur Klärung synaptischer Interaktionen

Hemitranssektionsexperimente konnten nach Durchtrennung der GABAergen striato-nigralen Bahn trotz eines deutlichen Abfalls des GABA-Gehalts und der GAD-Aktivität keinen völligen Ausfall hervorrufen (Kim et al., 1971; Kataoka et al., 1974; Fonnum et al., 1978). Einige der nigralen GAD-immunoreaktiven "punctate profiles" blieben erhalten (Ribak et al., 1980), auch nach Kainsäureläsionen im Caudatum/Putamen (Oertel et al., 1981d). Deshalb ist anzunehmen, daß die übriggebliebenen GAD-immunoreaktiven nigralen Terminalen von Nigra-Neuronen stammen, entweder von Projektionsneuronen, die viele lokale Axonkollaterale besitzen (Deniau et al., 1982; Grofova et al., 1982b) und/oder von einer Subpopulation GABAerger Interneurone (Frigyesi and Purpura, 1967; Francois et al., 1979). Die chemische Natur der postsynaptischen Partner dieser nicht-striatalen GABAergen Terminalen konnte bisher nicht bestimmt werden.

Nach Läsionen an verschiedenen Stellen der striato-nigralen Bahn, kombiniert mit Colchizininjektionen in unmittelbarer Nähe der SN zur Verstärkung der somatischen GAD-Immunreaktivität (Ribak et al., 1978), untersuchten wir auf ultrastruktureller Ebene, ob die GABAergen SNr-Neurone striatale oder nicht-striatale Afferenzen bekommen. Das Hauptaugenmerk wurde auf den fronto-medialen Teil der SNr gerichtet, der direkt unterhalb der SNc liegt. Ein Hauptzielgebiet der striato-nigralen Projektion ist der fronto-mediale Teil der SN, der zahlreiche GAD-immunoreaktive Neurone enthält (Grofova and Rinvik, 1970; Wassef et al., 1981). In dieser Region der SN sind zusätzlich die dendritischen Verästelungen der dopaminergen SNc-Neurone (Juraska et al., 1977) und vereinzelte, abgesetzte, dopaminerge Zellkör-

per zu finden (Oertel et al., 1982a), so daß eine genügende Anzahl GAD-negativer, postsynaptischer Ziele angenommen werden kann.

1.7.4. Dynorphine in der Substantia nigra

Die Aminosäuresequenz des Opioidpeptids Leu-Enkephalin (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH) ist in mehreren größeren Peptiden enthalten, die aus den Vorstufen Proenkephalin A und Proenkephalin B (Prodynorphin) hervorgehen. Ihr wird morphinartige Wirkung zugeschrieben. Die N-terminalen Enden von Dynorphin A (1-8), Dynorphin A (1-17) und Dynorphin B (1-13) weisen diese Sequenz auf. Alle drei Dynorphine entstehen aus Proenkephalin B (Zamir et al., 1984; Does and Akil, 1985; Taquet et al., 1985).

Immunhistochemische Studien haben die Verteilung von Dynorphin-immunoreaktiven Zellkörpern und terminalen Endigungen im Rattenhirn aufgezeigt (Vincent et al., 1982b; Watson et al., 1982). Immunoreaktive Perikaryen sind besonders in Hypothalamus, Amygdala und Caudatum/Putamen zu finden, während dichte terminale Felder in Hypothalamus, ventralem Pallidum und Substantia nigra nachgewiesen wurden. Die SN von Ratten, Rhesusaffen und Katzen enthält vor allem in der pars reticulata sehr viele Dynorphin-immunoreaktive Terminale (Khachaturian et al., 1982; 1985; Chesselet and Graybiel, 1983), aber keine Dynorphin-haltigen Zellkörper (Does and Akil, 1985). Läsionsstudien bei Ratten zeigten, daß dynorphinerge Zellkörper im Striatum zur SN projizieren (Vincent et al., 1982b; Zamir et al., 1984). Nach Untersuchungen von Fallon et al. (1985) sind die Dynorphin B immunreaktiven Terminalen in der SNr auf die Projektion vom medianen Caudatum/Putamen zurückzuführen. Striato-nigrale Dynorphin A-haltige Projektionsneurone haben ihre Zellkörper im Kopf des Caudatums (Palkovits et al., 1984). Beim Menschen ist der Gehalt an Dynorphin in der SNe höher als

in der SNr (Taquet et al., 1985). In postmortalem menschlichem Hirngewebe von Parkinson-Patienten konnte keine Veränderung des Dynorphingehalts festgestellt werden, wenn die Befunde mit Kontrollwerten verglichen wurden (Taquet et al., 1985).

Proenkephalin A scheint in der SN nicht mit Proenkephalin B zu koexistieren (Zamir et al., 1984). Im Radio-Immuno-Assay (RIA) war Leu-Enkephalin (nicht Met-Enkephalin) in gleicher Weise wie Dynorphinpeptide nach striatalen Läsionen betroffen (Christensson-Nylander et al., 1986). Das unterstützt die These, daß in der SNr Leu-Enkephalin wie Dynorphin A (1-17) aus Proenkephalin B entsteht.

Das molare Verhältnis von Dynorphin A (1-8) und Dynorphin A (1-17) in der SN ist annähernd 16:1 bei Ratten (Dores et al., 1985) und 6:1 bei Rhesusaffen (Dores and Akil 1985). Dynorphin A (1-17) ist ein hochselektiver Kappa-Agonist, während Dynorphin A (1-8) sowohl an Kappa- als auch Delta-Rezeptoren bindet (Chavkin and Goldstein, 1981; Corbett et al., 1982; Oka et al., 1982; Schulz et al., 1982). 70-80% der Opiatbindungsstellen in der SN befinden sich nicht an dopaminergen Neuronen, sondern möglicherweise präsynaptisch an nigralen GABA-Terminalen (Llorens-Cortes et al., 1979). Allerdings ist eine Wechselbeziehung zwischen Bindungsstellen und Opioid-Immunoreaktivität nicht immer gegeben (Lewis et al., 1986).

Anplikation von Opioidpeptiden in die SNr scheint die Aktivität der dopaminergen Zellkörper in der SNc zu beeinflussen (Hommer and Pert, 1983). Es wurde postuliert, daß Dynorphine eine Disinhibition dopaminergischer Zellen durch die Hemmung von Interneuronen in der SNr bewirken (Walker and Friederich, 1985).

1.8.2. Vergleich und Verteilung von GAD und Dynorphin A in Terminalen der Substantia nigra

Während über die ultrastrukturelle Verteilung von GABA und SP in der SN schon einige Befunde vorliegen (Ribak et al., 1976; Somogyi et al., 1982), gibt es noch keine elektronenmikroskopischen Untersuchungen hinsichtlich der Zuordnung von Dynorphin A zu bestimmten Boutontypen. Dies ist insbesondere unter dem Aspekt interessant, daß einige, aber nicht alle Neuropeptide nach vorläufigen Befunden mit GABA in striatalen Zellkörpern koexistieren (Graybiel, 1986). Die erwähnten GABAergen und dynorphinergen Projektionen zur SNr müßten also nicht getrennt verlaufen. Der Nachweis dieser möglichen Koexistenz von Dynorphin A und GAD in nigralen Boutons ist nur mit einer immunocytochemischen Doppelmarkierungstechnik auf ultrastruktureller Ebene möglich. Die Darstellung deutlich unterscheidbarer, elektronendichter, spezifischer Marker für jeden Transmitterkandidaten und die Entwicklung einer solchen doppelimmunocytochemischen Methode ist sehr zeitaufwendig und erfordert sorgfältiges methodisches Vorgehen.

1.9. Fragestellungen

1. Unterscheiden sich GAD- und GABA-Immunocytochemie im ultrastrukturellen Bereich ?
2. Welches ist der postsynaptische Partner der striato-nigralen GABAergen Afferenzen ?
3. Gibt es lokale GABAerge Axonkollaterale an SN-Neuronen?
4. In welchen Boutontyp(en) ist der andere striato-nigrale Transmitterkandidat, Dynorphin A 1-17, lokalisiert ?
5. Gibt es Hinweise auf eine Koexistenz der beiden striato-nigralen Transmitterkandidaten GABA und Dynorphin A in den gleichen Nervenendigungen ?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche Wistarratten mit einem Gewicht von 180-260 g. Sie wurden bei ca. 21°C Raumtemperatur und natürlichem Hell-Dunkel-Rhythmus in Makrolonkäfigen gehalten. Die Kleingruppen von 4-6 Tieren wurden 1x pro Woche in Kästen mit frischer Einstreu umgesetzt. Die Ratten erhielten artgerechtes Futter (Altromin-Pellets) und Wasser ad libitum.

2.2. Operationen

2.2.1. Kontrollen mit Colchizin

Fünf männliche Wistarratten, 220-260 g schwer, wurden mit Chloralhydrat narkotisiert (350 mg/kg, 10 ml/kg) und in einem stereotaktischen Gerät (David Kopf) operiert. Dazu wurde mit einem sagittalen Schnitt entlang der Pfeilnaht die Schädeldecke freigelegt, mit einem elektrischen Zahnbohrer nach den Koordinaten AP: +2 mm, L: 1,4 mm (aus dem Atlas von König und Klippel, 1963) ein Loch in die Schädeldecke gebohrt und die Kanüle einer Hamilton-Mikroinjektionsspritze mit V: +2 mm transcortikal in die weiße Substanz direkt über der linken Substantia nigra geschoben. Der Bregmaschnittpunkt der Schädelnähte oder der intraaurale Nullpunkt dienten als Orientierungshilfe. Geschlecht und Herkunft der Ratten spielen im Gegensatz zum Körpergewicht keine Rolle für die Festlegung der Injektionsstelle (Paxinos et al., 1985). Über eine Periode von 5 min wurden dann mit einem Mikromanipulator 0,5 µl einer frischen Colchizininlösung injiziert (Sigma, 10 µg in 0,12 M Phosphatpuffer). Nach der Injektion blieb die Nadel noch einige Minuten in ihrer Position und wurde dann vorsichtig herausgezogen. Der

Hautschnitt wurde geklammert oder mit Histoacryl (Braun-Dexon) verschlossen. Nach einer Überlebenszeit von 36-48 h wurden die Ratten perfusionsfixiert. Wundinfektionen traten aufgrund der kurzen Überlebenszeiten nicht ein.

2.2.2. Ibotensäureläsionen

Acht männliche Wistarratten, 180-230 g schwer, wurden narkotisiert und in einem stereotaktischen Gerät für Kleintiere (David Kopf) operiert. Durch ein Loch in der Schädeldecke bei AP: +7,5 mm und L: 2,6 mm wurden mit einer Hamiltonspritze 1 μ l Ibotensäurelösung (Ibotenic acid, Neurotoxin, Sigma, 20 μ g/ μ l in 0,2 M Phosphatpuffer) in den Kopf des Striatums, 3,5 mm unterhalb der Dura, injiziert (Abb.1). Zwei bis fünf Tage später wurde Colchizin in die Nähe der SN appliziert, und nach weiteren ein bis zwei Tagen wurden die Tiere perfusionsfixiert. Der größte Abstand zwischen Ibotensäureinjektion und Perfusion war sieben Tage.

Nur vier der acht Tiere wurden in die Auswertung übernommen. Sieben Tage war eine zu lange Überlebenszeit, um in der SN noch eine ausreichende Zahl degenerierter Boutons in synaptischem Kontakt zu finden. Bei einer Ratte war die Immunreaktion sehr schwach, bei einer weiteren lag der Injektionskanal an der Grenze zum Globus pallidus, und eine andere Läsion betraf große Teile des Nucleus accumbens.

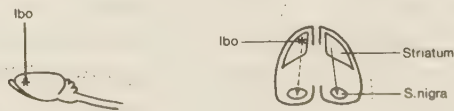


Abb.1: Schematische Darstellung der Ibotensäureläsion im Kopf des Striatums.

2.2.3. Pränigrale Hemitranssektionen

Drei männliche Wistarratten im Gewicht von 200-210 g wurden narkotisiert und stereotaktisch operiert. Durch einen Schlitz in der Schädeldecke bei AP: +2,6 mm und L: 0,5 bis 3,5 mm wurde ein längliches, scharfes Messer bis zur Basis des Craniums geführt und alle Vorderhirnafferenzen wurden von lateral bis medial vollständig durchtrennt. Unmittelbar danach erhielten die Tiere 1 μ l einer Colchizinlösung (20 μ g/ μ l) in die Schnittstelle injiziert (L: 1,6 mm und 6,6 mm unter der Dura). Vierzig Stunden nach dieser Hemitranssektion wurden die Ratten perfundiert.

2.3. Fixierung

Die Ratten wurden durch intraperitoneale Injektion mit Chloralhydrat (350 mg/kg, 10 ml/kg) in tiefe Narkose versetzt und anschließend zur Perfusion in Rückenlage fixiert. Nach Öffnen von Abdomen und Thorax wurde über den linken Ventrikel eine Kanüle in die aufsteigende Aorta geschoben und mit einer Klemme fixiert. Mit Beginn der Perfusion von 50-100 ml 0,9% NaCl-Lösung zur Spülung des Gefäßsystems, konnten über einen Schnitt im rechten Atrium Blut und Fixierlösung abfließen. Die anschließende Gewebsfixierung mit zunächst 4% Paraformaldehyd (Merck) und 0,1-0,2% Glutaraldehyd (Roth) in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde durch Abklemmung der absteigenden Aorta auf die obere Körperhälfte beschränkt. Nach zwanzig Minuten wurde eine zweite Fixierlösung mit 4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer 30 min langsam infundiert (ca. 10ml/min), um nichtgebundenes Glutaraldehyd auszuwaschen. Nach weiteren zwei Stunden wurde das Hirn entnommen und im zweiten Fixativ über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4. Vibratomschneiden

Die Hirnhälften wurden kurz in TBS 0,05 M, pH 7,4 gewaschen (TBS=Tris buffered saline) und zur Verbesserung der Antikörperpenetration in Stickstoff-gekühltem flüssigen Freon schockgefroren. Nach dem Auftauen wurde eine Hirnhälfte mit der lateralen Seite unter Zuhilfenahme von Histoacryl auf einem Metallblock in der Vibratomwanne fixiert und in gekühltem TBS (0,05 M, pH 7,4) sagittal mit dem Vibratom (Oxford) in 30-50 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden in mit TBS gefüllte Kulturschalen überführt und immunocytochemisch weiterbearbeitet. Jeder 7.Schnitt wurde als lichtmikroskopische Kontrolle auf Objektträger aufgezogen, mit Kresylviolett gefärbt und in Entellan (Merck) eingedeckelt.

2.5. Immunhistochemie

Antigene sind für das Immunsystem des Wirts fremde Proteine, die die Bildung von spezifischen Antikörpern induzieren und mit den produzierten Antikörpern reagieren. Antikörper sind als Immunglobuline in der Globulinfraktion (Ig) des Serums enthalten und bei immunhistochemischen Verfahren größtenteils dem Typ IgG zugehörig. Das isolierte oder synthetische Antigen wird einem Tier einer Species injiziert, das gegen diesen Fremdstoff Antikörper produzieren kann. Jedes Tier variiert in der Reaktion auf ein Antigen in Qualität und Quantität seiner polyclonalen Antikörper. Durch verschiedene Verfahren ist es möglich die Proteinbestandteile des Serums auf die spezifischen Antikörper zu reduzieren, sie zu testen und damit die Möglichkeiten unspezifischer Reaktionen im untersuchten Gewebe einzuschränken. Antikörper können mit chemischen Markern (z.B. für Fluoreszenztechniken) oder Immunkomplexen (z.B. PAP-Komplex) markiert werden und stehen dann mehreren Methoden

für immunhistochemische Markierungen zu Verfügung.

Für diese Arbeit wurden folgende primäre Antikörper verwendet:

1. Schafantikörper gegen Rattenhirn-GAD, entwickelt und charakterisiert von Oertel et al.(1981a).
2. Kaninchenantikörper gegen synthetisches Dynorphin A (1-17), Bachem AG; aus dem Labor von A.Herz, Martinsried.
3. Kaninchenantikörper gegen GABA/BSA von Immunonuclear.

Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden werden im folgenden beschrieben und in Abb.2 schematisch dargestellt.

2.6. Immunhistochemie an Vibratomschnitten

2.6.1. Die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP)

Diese Methode nach Sternberger (1979) benötigt drei Reagenzien: primäre und sekundäre Antikörper sowie einen Peroxidase/anti-Peroxidase-Komplex. Der Applikation des Primärserums mit Antikörpern der Species A folgt die Inkubation mit dem sekundären Antiserum der Species B gegen IgG der Species A. Ein Peroxidaseantikörper der Species A, im Komplex mit Meerrettichperoxidase (HRP) wird dann vom freien Arm des sekundären Antikörpers gebunden (s.Abb.2). Diese Verbindung des PAP-Komplexes (3 HRP-Moleküle) mit einem einzelnen, antigengebundenen primären Antikörper über die Brücke des sekundären Antikörpers, verstärkt das Antigen/Antikörper-Signal für den folgenden Färbeschritt und erhöht damit die Sensitivität im Vergleich zu direkt markierten Antikörpern. Mit Wasserstoffperoxid als Substrat für die Peroxidase und 3,3-Diaminobenzidin (DAB) als Elektronendonator bildet sich ein primärer Wasserstoffperoxid/ Peroxidase-Komplex, der in einen Wasserstoffperoxid/DAB-Komplex übergeht und sich vom intakten Enzym löst. Es entsteht ein braunes, elektronenabsorbierendes Präzipitat, das unlösli-

che, oxidierte DAB (Gosselin et al., 1986).

Die Vibratomschnitte wurden, in Anlehnung an die Methode von Oertel et al. (1981c), wie folgt bei Zimmertemperatur behandelt:

- 10 min mit 1% Natriumborohydrid (Sigma) in TBS (0,05 M, pH 7,4) zur Blockierung freier Aldehydgruppen (Lillie and Pizzolato, 1972). Die Lösung schäumt heftig bei Kontakt mit Gewebe, deshalb wurde anschließend mindestens 5x gründlich mit TBS gewaschen.
- 5 min 3% Wasserstoffperoxid/10% Methanol zur Blockierung der Aktivität der endogenen Peroxidase, anschließend 5x waschen mit TBS.
- 60 min 10% normales Kaninchenserum (NRS, Dako) bei GAD-Antiserum bzw. normales Ziegenserum (NGS, Dako) bei Dynorphin A- und GABA-Antiserum, mit 0,1 M L-Lysin (Sigma) in TBS zur Verminderung der unspezifischen Antikörperbindung. Außerdem blockieren die reaktiven Aminogruppen der sauren Aminosäure L-Lysin die freien Aldehydgruppen des restlichen bzw. unvollständig gebundenen Glutaraldehyds.
- Inkubation (24 Std. bei 20° C und 24 Std. bei 4° C) mit GAD-Antiserum 1:2000 und 2% NRS in TBS bzw. Dynorphin A- oder GABA-Antiserum 1:1000 oder 1:6000 mit 2% NGS in TBS, frei flottierend auf einem Schüttler.
- 3x waschen in TBS. 45-60 min mit Kaninchen-anti-Ziegenserum 1:50 mit 2% NRS (bei GAD-Antiserum) bzw. Ziegen-anti-Kaninchenserum 1:50 mit 2% NGS (bei Dynorphin A- und GABA-Antiserum) in TBS, anschließend 3x waschen mit TBS.
- 30 min mit Goat-PAP 1:100 (Sternberger) mit 2% NRS (bei GAD-Antiserum) bzw. Rabbit-PAP 1:100 mit 2% NGS (bei Dynorphin A- und GABA-Antiserum), anschließend 5x waschen mit TBS.
- 20 min Vorinkubierung mit 0,05% DAB in TBS, dann 5-15 min 0,05% DAB mit 0,01% Wasserstoffperoxid, unmittelbar vor Gebrauch gelöst in TBS. Die DAB-Färbung wurde lichtgeschützt durchgeführt, denn Lichteinfall katalysiert die Oxidation von DAB und führt ebenso zu unspezifischen Prä-

zipitaten (Weir, 1974) wie eine Inkubationszeit über 15 min. Die Reaktion wurde gestoppt durch fünfmaliges Waschen in eiskaltem TBS.

Zum Wechseln der Lösungen wurden jeweils neue Pipetten genommen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Ein Teil der Schnitte wurde aufgezogen und für lichtmikroskopische Betrachtung eingedeckelt, der Rest elektronenmikroskopisch aufbereitet.

2.6.2. Die Avidin-Biotin-Methode (ABC)

Diese Technik nach Hsu et al. (1981a) verwendet einen sekundären Antikörper, der mit Biotin gekoppelt ist. Die nachfolgende Applikation eines Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes führt zu einer Verbindung des Avidins mit dem Biotin des 2. Antikörpers. Der Vorteil dieser Methode liegt in der extrem hohen Affinität (Dissoziationskonstante 10^{-15} M^{-1}) von Biotin (= Vitamin H, MW=244) zu Avidin (basisches Glycoprotein, MW=68000). Das führt zu stabilen Verbindungen mit konstanter Sensitivität.

Die praktische Handhabung der ABC-Kits von Vector und die höhere Sensitivität der Methode mit einer geringeren Hintergrundfärbung waren den Qualitäten der PAP-Technik überlegen, so daß die meisten Experimente mit der ABC-Methode ausgeführt wurden. Das Verfahren ist vergleichbar mit der PAP-Technik, es wird lediglich der 2. Antikörper durch den biotinylierten Antikörper ersetzt, der in einer Verdünnung von 1:200 über 60 min auf die Schnitte einwirkt. Statt des PAP-Komplexes werden im nächsten Schritt die beiden ABC-Reagenzien nach Herstellerangaben 30 min vor Gebrauch verdünnt und gemischt und die Schnitte 90 min inkubiert. Der ABC-Komplex entsteht aus $10 \mu\text{g/ml}$ Avidin und $2,5 \mu\text{g/ml}$ Biotin-Peroxidase. Bei diesem Mengenverhältnis sind mehr als 3 Peroxidasemoleküle pro Biotinmolekül gebunden (Hsu et

al.,1981a). Die Farbmarkierung mit DAB/Wasserstoffperoxid erfolgt wie bei der PAP-Methode.

2.6.3. Immunogold-Methoden

Kolloidales Gold als Markierungssubstanz für die Immunocytochemie wurde von Faulk and Taylor (1971) eingeführt. Anfänglich war diese Methode auf eine Verwendung in der Elektronenmikroskopie beschränkt (Horisberger and Rosset,1977; Roth et al.,1978b; Bendayan and Zollinger,1983), später wurde sie auch für die Lichtmikroskopie modifiziert. Während die PAP-Methode von der Menge des zu bildenden Reaktionsprodukts und dem Grad der DAB-Färbung abhängt, ist die Bindung eines einzelnen Goldpartikels eindeutig. Durch das ungünstige Koppelungsverhältnis von 1:1 zwischen Antikörpermolekül und Goldpartikel im Zusammenhang mit Penetrationsproblemen und unspezifischen Immunreaktionen ist diese Methode unempfindlicher als die vorher beschriebene. Ihre Vorteile liegen in der größeren Genauigkeit bei der Lokalisation von Antigenen (Punktmarkierung) und der Möglichkeit der simultanen Lokalisation verschiedener Antigene am gleichen Schnitt mit unterschiedlichen Goldkorngrößen.

Für den schwierigen Transmitternachweis bei äußerst geringen Konzentrationen in Dendriten und Boutons waren goldmarkierte Streptavidinmoleküle vorteilhafter als Protein A- und IgG-Gold-Reagenzien (s.Anhang).

2.6.3.1. Die Streptavidin-Gold-Methode

Diese Methode ist prinzipiell der ABC-Technik ähnlich: Der zweite, biotinylierte Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, wird in diesem Fall durch Streptavidin-gekoppeltes kolloidales Gold markiert. Die Stärke der Interaktion von Biotin und Streptavidin (Disso-

ziationskonstante 10^{-15} M^{-1}) ermöglicht Detektionsmethoden mit kurzen Inkubationszeiten bei hoher Sensitivität und Spezifität.

Die Biotinylierung von Antikörpern geschieht ohne Schädigung der Antigen-Bindungseigenschaften (Guesdon et al., 1979). Allerdings wird die Streptavidin-Bindungsfähigkeit des Biotins nach Koppelung an ein Makromolekül stark eingeschränkt. Dieser Effekt kann durch ein chemisches Verbindungsglied ("spacer arm" = N-biotinyl- ω -aminocaproyl-N-hydroxysuccinimide) zwischen Makromolekül und Biotin vermieden werden, so daß Biotin und Streptavidin ungehindert reagieren können (Bonnard et al., 1984). Die verwendeten biotinylierten Antikörper (s.unten) wurden vom Hersteller (Amersham) mit dem spacer arm versehen.

Streptavidin ist ein Protein des Bakteriums *Streptomyces avidinii* (MW=60000) mit 4 Bindungsstellen pro Molekül für Biotin. Es hat zwar die gleichen Biotinbindungseigenschaften wie das Eiweißprotein Avidin, aber zwei wichtige Vorteile:

1. Der isoelektrische Punkt ist nahe dem neutralen pH-Wert, so daß Streptavidin nur wenige stark geladene Gruppen während der meisten Inkubationsschritte aufweist.
2. Streptavidin ist kein Glycoprotein und geht deshalb auch keine unspezifischen Bindungen mit z.B. Lektinen ein.

Streptavidin hat also die vorteilhaften, nicht aber die manchmal nachteiligen Eigenschaften von Avidin.

Nach der Behandlung mit dem primären Antiserum wurden die Vibratonschnitte mit dem spezifischen, sekundären, biotinylierten Antiserum vom Esel (D) gegen Ziegenantigen (DAG) in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:200 (mit TBS 0,05 M; pH 7,4) für 60 min inkubiert. Nach gründlichem Waschen erfolgte die Markierung mit Streptavidin/Gold (Amersham) in 15-45 min bei einer Verdünnung von 1:25 - 1:50 (in PB 0,05 M; 1% Ovalbumin (Sigma); pH 7,4). Kolloidales Gold bindet sich nicht kovalent an Streptavidin. Die geringe Korngröße von 5

nm begünstigt die Intensität der Immunreaktion und die Penetration der goldmarkierten Reagenzien (Lackie et al., 1985). Zur lichtmikroskopischen Begutachtung war eine Silberintensivierung der Schnitte nötig.

2.6.3.2. Silberintensivierung

Mit der Methode nach Danscher (1981) ist es möglich, die im Lichtmikroskop unsichtbaren Goldmarkierungen mit Hilfe eines modifizierten physikalischen Entwicklers so zu verstärken, daß die Immunreaktion als braunschwarzes bis schwarzes Präzipitat sichtbar wird und beurteilt werden kann. Der physikalische Entwickler muß neben einem Reduktionsmittel auch Silberionen enthalten, die durch metallisches Gold oder Silber reduziert werden können. Während des Entwicklungsprozesses bildet sich eine wachsende Hülle von metallischem Silber um jedes Goldkorn bis zur gewünschten Größe. Somit ist eine genaue lichtmikroskopische Lokalisation der Goldkörner und damit des gesuchten Antigens möglich. Der verwendete Entwickler bestand aus Silbernitrat als Ionenquelle und Hydroquinon als reduzierender Substanz in Citratpuffer mit Gummi arabicum.

Die Schnitte wurden in Anlehnung an van den Pol et al. (1985) wie folgt behandelt:

- nach der Goldinkubierung 1x waschen in TBS 0,05 M, pH 7,4; anschließend 1x waschen in Citratpuffer 0,1 M; pH 4,0
- Schnitte in Lösung aus 6,5 mM Silbernitrat und 76 mM Hydroquinon in 0,1 M Citratpuffer pH 4,0 mit 20% Gummi arabicum für 15-45 min (alle Zutaten von Sigma).

Die Lösungen wurden vor einfallendem Licht mit Alufolie geschützt und die Inkubation in einer Dunkelkammer bei Rotlicht durchgeführt. Das Mitführen von Nitrozellulosestücken mit angetrockneten Flecken der verwendeten Gold-Lösung genügte als vereinfachtes Testsystem für den richtigen

Ablauf der Intensivierung. Gewebeschnitte ohne Goldmarkierung dienten als Kontrollen für unspezifische Reaktionen, die direkt auf die Silberintensivierung zurückzuführen waren.

In Abständen von 10 min wurden Testschnitte entnommen, 2x mit Citratpuffer gewaschen und die Intensität im Lichtmikroskop geprüft. Bei Bedarf kamen die Schnitte in frische Entwicklerlösung zurück.

Nach Beendigung der Intensivierung wurden die Schnitte 2x in Citratpuffer, 5x in Phosphatpuffer 0,013 M; pH 7,4 gewaschen und für elektronenmikroskopische Untersuchungen aufbereitet bzw. auf Objektträger aufgezogen.

Erhebliche Erleichterung dieser Prozedur und bessere Ergebnisse brachte die Verwendung des Silver-enhancement-kits von Janssen. Die Schnitte wurden zunächst 15 min in 2% Glutaraldehyd/Puffergemisch nachfixiert, 3x mit ionenfreiem Wasser (Serva) gewaschen und bis zur gewünschten Intensität unter optischer Kontrolle inkubiert. Die Intensivierungslösung war bei gedämpftem Tageslicht mindestens 8 min haltbar, eisgekühlt bis zu 30 min. Nach Fixierung (2 min) und Waschen in ionenfreiem Wasser (3x) konnten die Schnitte der üblichen Weiterbehandlung unterzogen werden.

2.6.4. Doppelfärbung mit PAP/DAB und Streptavidin/Gold

Der komplizierte Ablauf der Doppelmarkierung, der sich aus der Kombination der schon beschriebenen Einzelfärbungen ergibt, wird in Tabelle 1 dargestellt. Sie verdeutlicht die Reihenfolge der verschiedenen Immunreaktionen in den 24 Einzelgefäßen einer Kulturschale am Beispiel eines Experiments.

Im ersten Teil wurden die Kaninchen-Antikörper gegen Dynorphin A (1-17) bzw. GABA mit dem PAP/DAB-Nachweis eingesetzt. Im 2. Teil der GAD-Antikörper mit der Streptavidin-Gold-Markierung. Um zu vermeiden, daß der 2. Antikörper des

2.Teils (=DAG) den 2.Antikörper des 1.Teils erkennen kann (=GAR), wurde die Reihenfolge des Ablaufs auch umgekehrt. Diese Vorsichtsmaßnahme erwies sich aber in der praktischen Anwendung als unnötig. Wichtiger war eine sofortige abschließende Glutaraldehydfixierung nach der empfindlichen Streptavidin-Gold-Markierung als letzten Teil der gesamten Doppel-Immunreaktion. Andernfalls war die Goldmarkierung im Elektronenmikroskop oftmals nicht aufzufinden. Die PAP-Methode erhielt den Vorzug gegenüber der ABC-Technik, um eine falsch-positive Reaktion durch ungebundenes Biotin vom 1.Teil und Streptavidin vom 2.Teil der Doppelfärbung zu vermeiden. In die Auswertung kamen nur solche Schnitte, die eine nicht zu kräftige, eindeutige DAB-Färbung aufwiesen. DAB neigt bei intensiver Färbung zu körnigem Niederschlag und könnte eine Goldmarkierung vortäuschen. Die eingesetzten Einzel- und Doppelkontrollen ohne 1.Antikörper, sowie die begleitenden Markierungen einzelner Antigene für LM und EM bei jedem Experiment sind Tabelle 1 zu entnehmen.

2.6.5. Kontrollen

Bei allen Experimenten wurden Serumspezifitätskontrollen durchgeführt. In diesen Fällen war das primäre Antiserum durch Normalserum einer anderen Spezies in hoher Konzentration (10%) bzw. der gleichen Spezies in der für das primäre Antiserum üblichen Konzentration, oder durch Pufferlösung zu ersetzen. Zur Qualitätskontrolle der anderen verwendeten Seren wurden der 2. bzw. 3.Antikörper durch Pufferlösung ersetzt. Bei Experimenten mit kolloidalem Gold konnte durch parallel mitgeführte ABC-Serien bei gleichen Antikörpern die Reaktivität des 1.Antikörpers und die Wirksamkeit äußerer Einflüsse, wie Raumtemperatur und Laufzeiten verglichen und beurteilt werden (Tab.1).

	1	2	3	4	5	6
A	NLS-Lysin 1. Dyn. 1:1000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100	NLS-Lysin 1. Dyn. 1:1000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100	NLS-Lysin 1. GABA 1:6000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100		NLS-Lysin 1. Dyn. 1:1000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100 für LM	NLS-Lysin 1. _____ 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100 für LM
B	NLS-Lysin 1. GABA 1:6000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100 für LM	NLS-Lysin 1. Dyn. 1:1000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100	NLS-Lysin 1. GABA 1:6000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100	NLS-Lysin 1. _____ 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100	NLS-Lysin 1. Dyn. 1:1000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100 für EM	
C	NLS-Lysin 1. Dyn. 1:1000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100		NLS-Lysin 1. GABA 1:6000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100	NLS-Lysin 1. _____ 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100		NLS-Lysin 1. _____ 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100
D	NLS-Lysin 1. Dyn. 1:1000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100	NLS-Lysin 1. GABA 1:6000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100 für EM	NLS-Lysin 1. GABA 1:6000 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100			NLS-Lysin 1. _____ 2. GAR 1:50 3. R-PAP 1:100

	1	2	3	4	5	6
A	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 für LM	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 LM + Ag		
B		NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 LM, s.T.+Ag	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50		NDS-Lysin 1. _____ 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 LM + Ag
C	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 EM ohne Ag	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 LM, s.T.+Ag	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 LM, s.T.+Ag	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. ABC für EM	NDS-Lysin 1. _____ 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 LM, s.T.+Ag
D	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50		NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50 LM + Ag	NDS-Lysin 1. GAD 1:2000 2. b.DAG 1:200 3. ABC für LM	NDS-Lysin 1. _____ 2. b.DAG 1:200 3. Str/Au 1:50

Tabelle 1: Verlauf der Doppelfärbung eines Experiments.

Die Reihen A und B enthalten Schnitte der rechten, C und D der linken Hirnhälfte.

GAD = Glutamatdecarboxylase-Antiserum; NDS = normal donkey serum; b.DAG = biotinyliertes donkey anti goat serum; Str/Au = Streptavidin-Gold (5nm)-Lösung; LM = Lichtmikroskopie; EM = Elektronenmikroskopie; Ag = Silberintensivierung; NLS = normales Lammserum; Dyn. = Dynorphin A (1-17)-Antiserum; GABA = γ -Aminobuttersäure-Antiserum; GAR = goat anti rabbit serum; R-PAP = rabbit-peroxidase anti peroxidase serum.

2.7. Elektronenmikroskopische Aufarbeitung der Vibratomschnitte

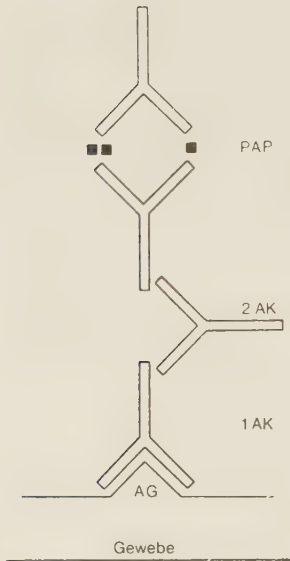
Nach Abschluß der immunhistochemischen Schritte wurden die Vibratomschnitte wie folgt weiterbehandelt:

- Die Substantia nigra und andere interessierende Regionen wurden unter einem Makroskop ausgeschnitten und protokolliert.
- 5x waschen in 0,013 M Phosphatpuffer (PBS), pH 7,4.
- 30 min mit 0,1% Osmiumtetroxid (TAAB; Serva) in ionenfreiem Wasser oder PBS bei 4°C nachfixieren.
- 5x waschen in ionenfreiem, kaltem Wasser.
- dehydrieren in folgenden Schritten bei 4°C:
 - je 5 min 25% und 50% unvergällter Alkohol (Ethanol).
 - 60 min 70% Ethanol mit 1% Uranylacetat (Merck) als Blockkontrastmittel.
 - je 5 min 80%, 90%, 96% Ethanol.
 - 2x 10 min 100% Ethanol.
- 10 min 1:1 Gemisch aus Propylenoxid/100% Ethanol.
- 3x 10 min Propylenoxid (Serva).

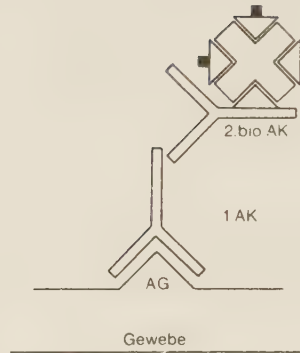
Einbettungsschritte:

- 1:1 Gemisch aus Propylenoxid/Epon mit Accelerator, über Nacht auf Schüttler im Abzug.
- 2-5 Stunden in frischem Epongemisch in Schnappdeckeln mehrfach entgasen bei 45°C.
- Einbetten in Beemkapseln. Dabei wurde jeweils ein Schnitt auf einen kleinen Epontropfen in einen Beemkapseldeckel gelegt und mit einem polymerisierten Eponstempel vorsichtig flachgedrückt. Stempel und Deckel passten genau ineinander und fixierten den Schnitt in seiner Lage. Die Polymerisierung erfolgte im Trockenschrank bei 45°C (1 Tag) und 60°C (2 Tage). Nach dem sorgfältigen Trimmen des Blocks wurden Ultradünnschnitte (Diamant von Diatome; Reichert Ultracut) direkt von der Oberfläche des Vibratomschnitts gemacht (Abb.3). Zu beachten war dabei die

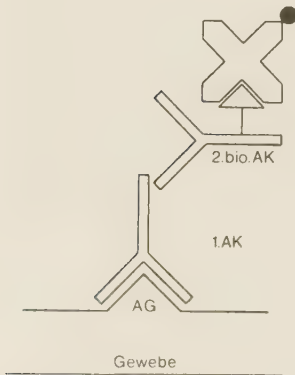
geringe Eindringtiefe der Antikörper von wenigen μm , weil auf jegliche Verwendung von Detergentien zugunsten eines besseren Strukturerhalts verzichtet wurde. Die Ultradünnschnitte wurden auf unbefilmten Nickelgrids (super 200 mesh, Polaron) aufgefangen, mit 0,3% Bleicitrat nach Venable and Coggeshall (1965) 4-6 min kontrastiert und in einem Zeiss EM 10 untersucht.



PAP - Methode



Avidin - Biotin - Methode



Streptavidin - Gold - Methode

- ✕ • Avidin
- ✕ • Streptavidin
- △ • Biotin
- • kolloidales Gold (5 nm o)
- • Peroxidasesmolekül
- bio. • biotinyliert
- AG • Antigen
- AK • Antikörper
- PAP • Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex

Abb.2 Die verwendeten immunhistochemischen Methoden im Überblick

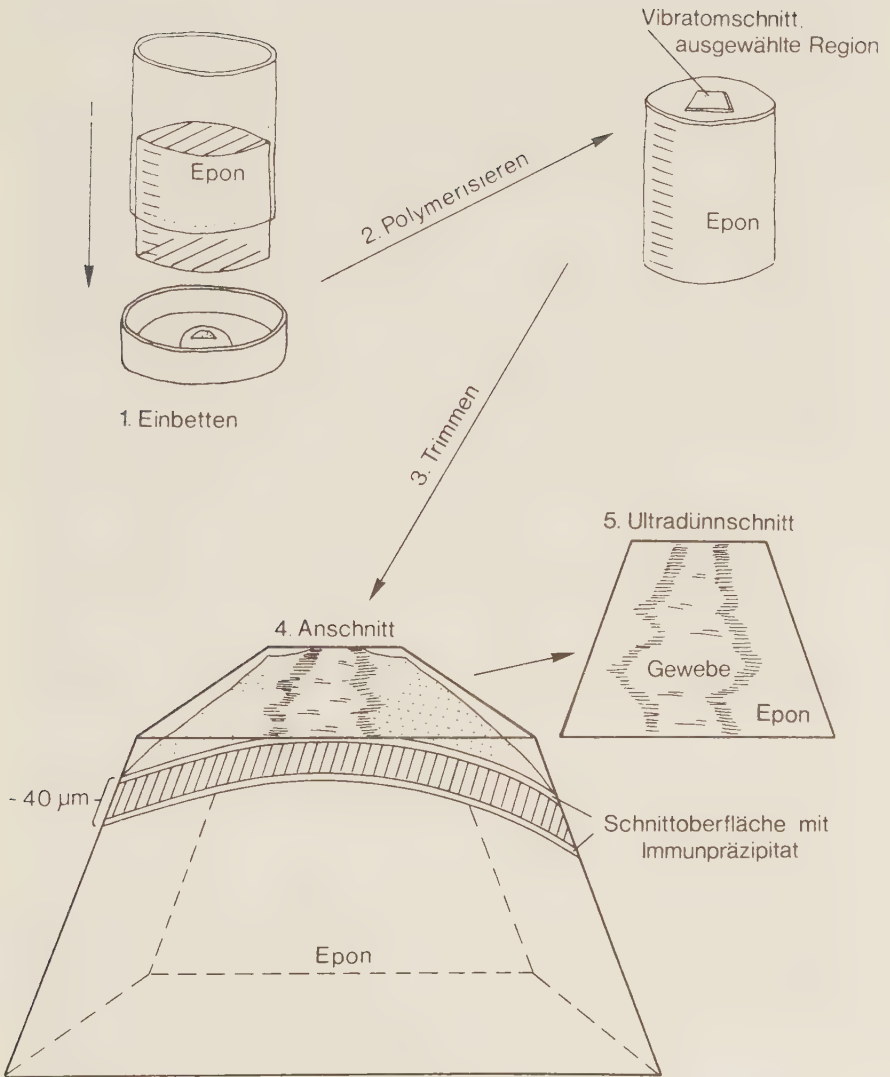


Abb.3 Methode der Flacheinbettung von Vibratomschnitten zur Anfertigung von ultradünnen Oberflächenschnitten

3. ERGEBNISSE

3.1. GAD-Immunocytochemie an Kontrolltieren

In lichtmikroskopischen Untersuchungen von Vibratom-schnitten der SN von nicht-operierten rechten Gehirnhälften und Gehirnen unbehandelter Tiere, konnte GAD-Immunoreaktivität in Zellkörpern, Dendriten und punktförmigen Strukturen besonders gut mit der Streptavidin-Gold-Methode nach Silberintensivierung nachgewiesen werden (Abb.4a,9b+c). Diese punktförmigen Strukturen waren in hoher Dichte in der ganzen SN zu finden, wo sie Zellkörper und Dendriten umgaben und sich damit als lichtmikroskopisches Äquivalent der GAD-immunoreaktiven Nervenendigungen darstellten. Zahlreiche GAD-haltige Zellkörper in der SN wurden erst nach Colchizininjektionen im Gebiet der SN sichtbar (vgl.Abb.5a+b).

Im Elektronenmikroskop konnte das Immunpräzipitat nach PAP- und ABC-Immunreaktionen als flockiger, elektronendichter Niederschlag identifiziert werden. Er wurde in den Perikaryen frei im Cytoplasma gefunden oder war an der Oberfläche der Mitochondrien, in der Nähe des Golgiapparates und der Nisslkörper abgelagert. In Dendriten war das Reaktionsprodukt an Neurotubulimembranen, Mitochondrienoberflächen und an der Zellmembran zu finden. In Nervenendigungen umgab das Immunpräzipitat Mitochondrienoberflächen und pleomorphe, synaptische Vesikel.

Nach Colchizininjektionen war durch die neurotoxische Wirkung zusätzlich zur kurzen Glutaraldehydfixierung und bedingt durch die lange histochemische Markierungsprozedur der ultrastrukturelle Erhalt des nigralen Gewebes nicht optimal. Neuronale Strukturen und Gliaelemente waren gelegentlich geschwollen und enthielten große, ungleichmäßig geformte intrazelluläre Vakuolen sowie Membranwirbel und Brüche des endoplasmatischen Retikulums.

GAD-positive SNr-Neurone hatten runde, spindelförmige, längliche und am häufigsten vielgestaltige Zellformen und

variierten in Größe (10-20 μm in ihren kleinsten Zellkörperdurchmessern) und Kerngestalt. Große GAD-positive Neurone hatten in der Regel runde Nuklei mit einer oder mehreren Einfaltungen der Kernoberfläche, während mittelgroße und kleine GAD-positive Neurone oft tief eingeschnittene und manchmal sogar gelappte Kerne aufwiesen (Abb.5c). Allerdings verstärkte der Zufall bei der Wahl der Schnittebene den Eindruck der Größenunterschiede und einer möglichen Formvariabilität. Die Struktur der granulären Cisternen des endoplasmatischen Retikulums in immunoreaktiven Neuronen war nach Colchizininjektionen unverändert, so daß eine neurotoxische Wirkung von Colchizin auf das empfindliche endoplasmatische Retikulum nicht nachzuweisen war. Die immunreaktiven Zellkörper bildeten sowohl kräftige primäre Dendriten, 2-3 μm im Durchmesser, als auch dünnere.

In den meisten Fällen waren die synaptischen Kontakte der immunoreaktiven Boutons mit GAD-positiven und -negativen Dendriten und Zellkörpern symmetrisch. Allerdings war die postsynaptische Membran bei GAD-positiven Partnern oft durch Reaktionsprodukt maskiert (Abb.6a,8a). In seltenen Fällen hatten GAD-haltige Boutons asymmetrische Kontakte mit dendritischen Dornen (spines). In der Regel war ein zentraler GAD-immunoreaktiver Dendrit rosettenförmig mit Boutons umgeben, von denen viele Reaktionsprodukt enthielten. Aber auch Dendriten ohne GAD-Immunreaktivität erhielten GAD-positive Afferenzen (Abb.6b). Boutons mit länglichen Vesikeln (in Abb.6a markiert mit "II" nach der Einteilung von Hajdu et al.,1973), deren Herkunft nicht bekannt ist, und Boutons mit kleinen, runden Vesikeln und einem asymmetrischen Kontakt (in Abb.6a markiert mit "III"), die teilweise cortico-nigraler Herkunft sind (Nitsch et al.,1984) waren nicht immunoreaktiv.

GAD-immunoreaktive Terminale waren in Ultradünnschnitten nicht homogen verteilt. Bereiche mit einer hohen Dichte GAD-positiver Boutons folgten auf Stellen mit wenigen oder keinen immunoreaktiven Terminalen.

3.2. GABA-Immuncytochemie an unbehandelten Tieren

Die Verteilung des Immunpräzipitats nach Inkubierung mit dem GABA-Antiserum von INC war bei lichtmikroskopischer Betrachtung weitgehend identisch mit der GAD-Verteilung. Die erwartete Zellkörperfärbung in der SNr war auffallend blaß und geringer als nach GAD-Antiserum-Inkubierung. Mit der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:5000 kam es zu einer deutlichen Hintergrundfärbung und intensiver Markierung. Die Verdünnung von 1:6000 führte zu einer merklich schwächeren Intensität des Immunpräzipitats sowie der Hintergrundfärbung. Zellkörper wurden bei dieser Verdünnung nur sehr schwach oder gar nicht gefärbt.

Im Elektronenmikroskop konnte die Hintergrundfärbung überwiegend auf Gliagewebe zurückgeführt werden. Durch die geringe Eindringtiefe wurden nur im Gewebeanschnitt positive Boutons gefunden. Sie gehörten zum Typ der GAD-immunoreaktiven Boutons mit symmetrischen synaptischen Kontakten und pleomorphen Vesikeln (Abb.6d). Positive Dendriten und - sehr selten - Somata waren auch tiefer im Gewebe anzutreffen und in der Regel intensiver gefärbt als nach GAD-Immunreaktionen in vergleichbaren Experimenten. In größerer Zahl wurden GABA-immunoreaktive myelinisierte Axone gefunden (Abb.6c). Die Intensität der Immunreaktion in Boutons war nicht stärker als bei GAD-Immuncytochemie.

3.3. GAD-Immuncytochemie nach Ibotensäureläsionen des Striatumkopfes

Nach Ibotensäureinjektion in den Kopf des Striatums (Abb.1+4b) bildet sich eine Zone nekrotischen Gewebes um die Injektionsstelle, die bis zu 750 μm im Durchmesser einnehmen kann. Im weiteren Umkreis bis 1500 μm findet man Nervenzellverlust und reaktive Gliose. Solche begrenzten Läsionen führten zu Boutondegenerationen in der gesamten

SNr. Die Zellkörper dieser degenerierten Boutons sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit im Striatum lokalisiert und in großer Zahl GABAerg, wie an der mangelnden Terminalfärbung in Abb.7a deutlich wird. Drei Tage nach der Injektion des Neurotoxins, als die terminale Degeneration noch nicht voll entwickelt war, konnten im Elektronenmikroskop graue, kaum strukturierte, degenerierte Boutons vereinzelt in synaptischem Kontakt mit GAD-immunoreaktiven Dendriten gefunden werden (Abb.7c). Viele degenerierte Terminalen wirkten gequollen und hatten aufgeblähte Mitochondrien. Vesikel waren nicht mehr zu erkennen. Boutons mit geschwollenen Vesikeln wurden nicht als degeneriert gewertet, weil dieser Effekt auch durch Colchizin hervorgerufen sein könnte. Nach fünf Tagen Überlebenszeit wurden degenerierte Boutons auch in Kontakt mit GAD-negativen Dendriten gesehen (Abb.7b). Degenerierte Terminale schienen mehr synaptische Kontakte mit GAD-positiven Elementen zu bilden als mit negativen. In vielen Fällen waren positive wie negative Dendriten von positiven, negativen und degenerierten Terminalen umgeben (Abb.7b+c). Mit fortschreitender Degeneration (5-7 Tage Überlebenszeit) waren, als Folge der Gliareaktion, die Kontakte mit den postsynaptischen Partnern oft nicht mehr zu erkennen.

3.4. GAD-Immunocytochemie nach pränigraler Hemitranssektion

Bei diesen Experimenten, mit einem Messerschnitt am frontalen Pol der SN, ging es um die Frage: Sind nach kompletter Durchtrennung aller Vorderhirnafferenzen noch GABAerge Boutons in der SN zu finden ?

Vierzig Stunden nach dem Eingriff waren Boutondegenerationen, retrograde neuronale Degenerationen und Gliareaktionen erwartungsgemäß massiv. Dennoch wurden zahlreiche gut erhaltene GAD-immunoreaktive Boutons in symmetrischem Kontakt mit Somata oder Dendriten von GAD-positiven Neuro-

nen gefunden (Abb.8a+b). Ebenfalls symmetrische Kontakte bestanden zwischen GAD-haltigen Boutons und nicht-immunoreaktiven Dendriten (Abb.8c). In seltenen Fällen stand ein GAD-immunoreaktiver Bouton in synaptischem Kontakt sowohl mit einem GAD-positiven wie GAD-negativen Dendriten (Abb.8b). Gelegentlich enthielt ein GAD-negativer Dendrit, in synaptischem Kontakt mit einem GAD-positiven Bouton, eine Ansammlung synaptischer Vesikel (Abb.8d). Solche Dendriten könnten zu dopaminergen Neuronen gehören. Es gibt Hinweise auf dendro-dendritische und möglicherweise dendro-axonische Synapsen der Dendriten dopaminergere Neurone (Wilson et al., 1977; Reubi and Sandri, 1979).

3.5. GAD-Immunocytochemie mit Streptavidin/Gold und Silberintensivierung an unbehandelten Tieren

Mit dieser neuartigen Methode gelang ein deutlicher, kontrastreicher und genauer Nachweis der Verteilung von GAD im Rattengehirn (Abb.4a und 9b). Die Hintergrundfärbung war bei optimalem Verlauf der Silberintensivierung selbst bei dicken Vibratonschnitten äußerst gering. Durch die kontrastreichen Silberkörnchen sind im Lichtmikroskop Bouton-ähnliche Strukturen zu erkennen, die negative und positive Dendriten und Somata einrahmen (Abb.9c). Außer dieser deutlichen, weil kontrastreichen Auflösung, war kein Unterschied zur PAP-Methode zu erkennen.

Die Silberintensivierung bewirkt eine deutliche Verschlechterung der Ultrastruktur und eine Veränderung und Maskierung der Vesikelformen (Abb.10b). Außer der Vergrößerung der Goldpartikel brachte sie keine Vorteile für die elektronenmikroskopische Begutachtung, obwohl sie im Lichtmikroskop eine Beurteilung erst ermöglichte. Die winzigen Goldpartikel sind durch ihre Elektronendichte eindeutig zu erkennen und führen nicht zur Maskierung der synaptischen Kontakte. Auch mit dieser Methode wurden die typischen

GAD-Boutons markiert. Die Goldpartikel waren dabei fast ausschließlich in engem Kontakt mit Vesikelmembranen aufzufinden (Abb.10a).

3.6. Dynorphin A-Immunocytochemie an unbehandelten Tieren

In allen Teilen der SNr waren weder im lichtmikroskopischen Überblick noch bei intensiver Durchmusterung im Elektronenmikroskop immunoreaktive Zellkörper oder Dendriten zu finden. Die vor allem im antero-basalen Bereich vorkommenden Dynorphin-haltigen Boutons (Abb.9a) hatten in elektronenmikroskopischen Abbildungen ein vielfältiges Erscheinungsbild mit Unterschieden in der Größe und Form von Vesikeln und bildeten sowohl symmetrische als auch asymmetrische Kontakte mit Dendriten. Bis auf den Grenzbereich zur SNc mit wenigen axo-somatischen Kontakten gab es im antero-basalen Bereich der SNr nur axo-dendritische Kontakte von dynorphinergen Boutons mit nicht-dynorphinergen postsynaptischen Partnern. Aus dieser Vielfalt ließen sich zwei deutlich unterscheidbare Typen charakterisieren. Dynorphin-immunreaktive Boutons mit großen, pleomorphen Vesikeln in symmetrischem Kontakt mit Dendriten entsprachen dem Bouton-Typ I nach Hajdu et al. (1973) und Rinvik and Grofova (1970) und wurden als Typ A bezeichnet (Abb.11a). Längliche Terminale mit kleineren, überwiegend runden, teilweise pleomorphen Vesikeln enthielten oftmals auffallende Mitochondrienansammlungen und hatten ausgeprägte asymmetrische dendritische Kontakte (Abb.11c, Typ B der Klassifizierung). Weniger häufig waren Boutons mit sehr kleinen, pleomorphen Vesikeln und symmetrischen dendritischen Kontakten (Abb.11d). Sehr selten wurden Boutons gefunden, die runde, spärlich im hellen Lumen verteilte Vesikel enthielten und asymmetrische Kontakte mit Dendriten bildeten (Abb.11b). Wenn auch der Zufall bei der Wahl der Schnittebene eine große Rolle gespielt hat, so ist doch festzustellen, daß

die Variabilität der Vesikelgröße und -form bei dynorphinergen Boutons, im Vergleich zu benachbarten nicht-immunoreaktiven Terminalen (Abb.11c+d), nicht auf Fixierungs- oder Einbettungseinflüsse zurückzuführen ist. Diese charakteristischen Unterschiede ließen sich in einer Vielzahl von Experimenten nachweisen.

Die Verteilung des Reaktionsprodukts in den dynorphinergen Boutons ist vergleichbar mit der Verteilung in GAD-immunoreaktiven Boutons. Es ist der äußeren Membran der Vesikel und Mitochondrien und vor allem präsynaptisch der Zellmembran angelagert. Die Dynorphin-Immunreaktion war deutlich schwächer als die GAD-Immunreaktion (vergl. Abb.6-8 und 11) und erreichte nur selten deren Intensität. Dabei schienen Boutons des Typs B nicht nur im direkten Vergleich intensiver angefärbt zu sein als Typ A-Boutons. Vermutlich täuschen Vesikeldichte und das geringere Lumen der Vesikel eine stärkere Intensität vor. In rosettenartigen Boutonanordnungen mit einem zentralen Dendriten waren Dynorphinpositive Boutons - im Vergleich zu ähnlich angeordneten GAD-immunoreaktiven Boutons (Abb.6b, 10a+b) - häufig nur einzeln vertreten (Abb.11d). Nicht-immunoreaktive, durch Membranen abgegrenzte Vesikeleinschlüsse in Boutons des Typs A (Abb.11a) sind entweder auf degenerative oder regenerierende Prozesse oder auf Einstülpungen nicht-immunoreaktiver benachbarter Boutons zurückzuführen. Axo-axonische Kontakte wurden jedoch nicht beobachtet. Bei der Formenvielfalt dieser heterogenen Gruppe von dynorphinergen Boutons gleichen GAD- bzw. GABA-haltige Boutons nur dem Typ A der dynorphinergen Terminalen. Das markierte Dynorphin A ist also nach morphologischen Kriterien größtenteils in anderen Boutons lokalisiert als GABA oder das GABA-synthetisierende Enzym GAD. Eine mögliche Koexistenz beider Transmittersubstanzen sollte demnach nur in Boutons des Typs A möglich sein.

3.7. Doppel-Immuncytochemie

Im Anschluß an die Lokalisation einzelner Antigene und die morphologische Charakterisierung der neuronalen Strukturen sollte durch aufeinanderfolgende Inkubationen der Vibratonschnitte mit den verschiedenen Antisera eine Doppelfärbung erreicht werden, die eine Verteilung der bekannten immunoreaktiven Strukturen zueinander zeigen konnte. Die Doppelfärbung fand unter den gleichen Bedingungen wie die Einzelfärbungen statt. Um ein schrittweises, kontrolliertes Vorgehen zu ermöglichen, wurde diese zeitraubende Prozedur einer schnelleren vorgezogen, bei der die primären und sekundären Antikörper jeweils gleichzeitig ihre Antigene binden können.

3.7.1. Doppel-Immuncytochemie mit Dynorphin A/PAP und GAD/Streptavidin-Gold an unbehandelten Tieren

3.7.1.1. Lichtmikroskopischer Nachweis

Die blasse Dynorphin-Immunreaktion wurde in allen Fällen von der vorhergehenden oder nachfolgenden GAD/Streptavidin-Gold-Immunreaktion mit anschließender Silberintensivierung maskiert. Durch die fehlende Zellkörperfärbung in der SNr war somit eine lichtmikroskopische Begutachtung der Doppelfärbung unmöglich. Lediglich aus den parallel mitgeführten Einzelfärbungen unter gleichen Bedingungen konnte auf eine erfolgreiche Doppelfärbung geschlossen werden.

3.7.1.2. Elektronenmikroskopischer Nachweis

Ultrastrukturell konnten die beiden Hauptklassen von Dynorphin-immunoreaktiven Boutons (Typ A und B) neben den GAD-immunoreaktiven Boutons identifiziert werden (Abb. 12a+b und 13a+b). Die dynorphinergen Boutons, mit teilweise

gebleicht wirkendem Reaktionsprodukt, wiesen die bereits beschriebenen Charakteristika auf: Unterschiede in synaptischen Kontakten und Vesikelformen im Vergleich zu GAD-Boutons. Die Teilpopulation der Dynorphin-haltigen Boutons mit der gleichen Ultrastruktur wie GAD-immunoreaktive Terminale gab in keinem Fall einen Hinweis auf eine Koexistenz mit GAD. Es wurden keine Goldpartikel zusammen mit DAB-Immunpräzipitat im gleichen Bouton gefunden. Im Gegenteil: Gruppen von Dynorphin-haltigen Boutons schienen getrennt von GAD-haltigen Boutons zu existieren. Berührungspunkte mußten gesucht werden um beide Immunreaktionen auf ein Bild zu bekommen. Selten waren Kontakte von Dynorphin-positiven und GAD-positiven Boutons mit dem gleichen Dendriten (Abb.12b und 13b). Die GAD-Streptavidin-Gold-Reaktion war generell tiefer im Gewebe anzutreffen als die Dynorphin/PAP-Reaktion, die auf den unmittelbaren Gewebsanschnitttrand beschränkt blieb. Möglicherweise ist die Vesikelspeicherung (Dynorphin) bzw. der Enzymcharakter (GAD) eine Ursache dieser Verteilung.

In silberintensivierten Schnitten konnten keine Dynorphin-positiven Boutons nachgewiesen werden; eine Folge der starken Veränderungen der Ultrastruktur bei dieser Prozedur.

3.7.2. Doppel-Immunocytochemie mit GABA/PAP und GAD/Streptavidin-Gold an unbehandelten Tieren

Wie bei der Dynorphin/GAD-Doppelfärbung ist auch in diesem Fall die GAD-Markierung mit 5 nm kleinen Goldpartikeln an Streptavidinmolekülen von der Fixierung abhängig. Sie wird damit zum limitierenden Faktor. Oft ist eine Markierung nur äußerst oberflächlich und damit unmittelbar am Gewebeanschnitt möglich. Zusätzlich wird sie durch die vorhergegangene PAP-Reaktion erschwert. Trotz der schlechten Qualität des GABA-Antikörpers führte diese als Methodenkontrolle gedachte Doppelfärbung zu dem Ergebnis, das sich

beide immuncytochemischen Methoden nicht durch Maskierung oder sterische Hindernisse nach der 1.Färbung ausschließen müssen.

Abb.14 zeigt die immuncytochemische Doppelfärbung mit (GABA/PAP, Abb.14a) und der nachfolgenden GAD/Strept.Gold-Färbung (Abb.14b) der SN im gleichen Experiment am gleichen Tier. Die schwache GABA-Färbung wird zwar durch die Silberintensivierung verdeckt, dennoch findet sich nur dort Reaktionsprodukt, wo es nach der bekannten GAD- bzw. GABA-Verteilung lichtmikroskopisch zu erwarten ist (Abb.14b).

Im Elektronenmikroskop waren doppelmarkierte Boutons nur unmittelbar an der Gewebeoberfläche zu finden und deshalb von vergleichsweise schlechtem ultrastrukturellem Erhalt. Um dennoch ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten, wurden vor allem silberintensivierte Schnitte ultrastrukturell untersucht. Dabei konnten zusammen mit der gebleicht wirkenden DAB-Färbung des GABA/PAP-Reaktionsprodukts die silberintensivierten Goldpartikel der GAD/Streptavidin-Gold-Markierung in typischen GAD-Boutons gefunden werden (Abb.14c). Somit ist eine tatsächlich vorliegende Koexistenz zweier verschiedener Antigene in Boutons mit dieser Technik nachweisbar.

Neben dieser Koexistenz von GAD und GABA gab es Stellen, an denen manche Dendriten und Boutons nur GABA- oder GAD-Markierung aufwiesen. GABA-positive Axone zeigten keine GAD-Immunreaktion. Vermutlich sind Konzentrationsunterschiede von GABA und GAD ein Grund für diese Beobachtung.

Legende zu Abb.4

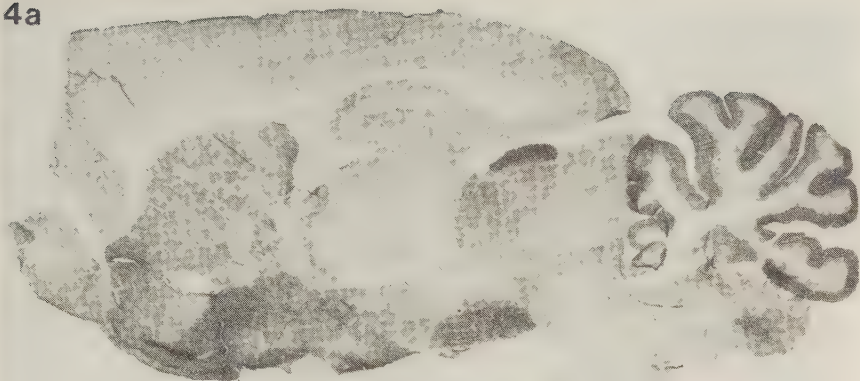
Abb.4a: Der sagittale Gefrierschnitt eines Rattengehirns zeigt im lichtmikroskopischen Überblick nach Immunreaktion mit GAD-Antikörper und Streptavidin-Gold-Markierung mit daran anschließender Silberintensivierung die Verteilung von GAD, die als Folge der regionalen GAD-Konzentrationsunterschiede sehr variabel ist. Charakteristische Regionen mit mittelstarker bis intensiver Färbung sind in Abb.4b bezeichnet.

Vergrößerung 7,5x

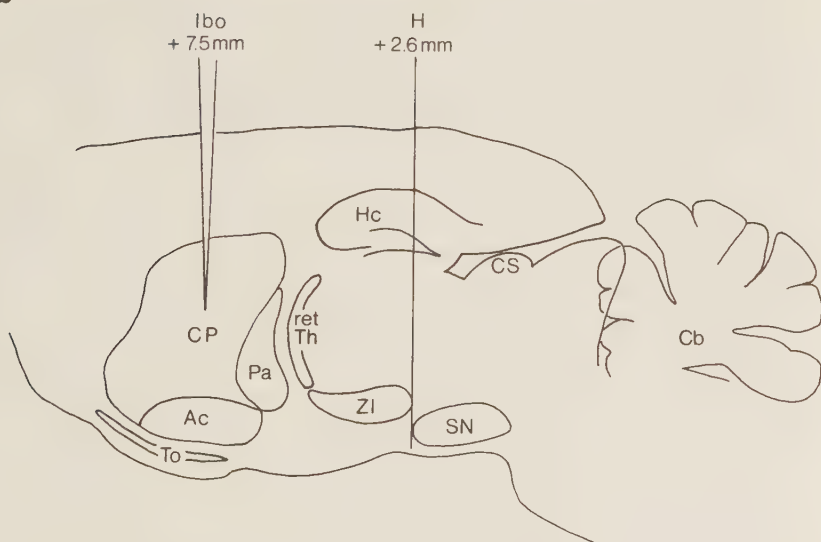
Abb.4b: Schemazeichnung nach Abb.4a mit den AP-Koordinaten der Läsionen nach dem Atlas von König und Klippel.

Ibo=Ibotensäureinjektion; H=pränigrale Hemitranssektion; Ac=Nc.accumbens septi; Cb=Cerebellum; CP=Caudatum/Putamen-Komplex (Striatum); CS=Colliculus superior; Hc=Hippocampus; Pa=Pallidum; ret Th=Nc.reticularis thalami; SN=Substantia nigra; To=Tuberculum olfactorium; ZI=Zona incerta.

4a



b



Legende zu Abb.5

Abb.5a: Lichtmikroskopische Aufnahme eines sagittalen Vibratomschnitts (ca.40 μ m dick) durch die Substantia nigra (SN) einer nicht-operierten Gehirnhälfte nach GAD/ABC-Immunreaktion. Neben einer gleichmäßigen Terminalfärbung sind nur wenige, schwach markierte Zellkörper GAD-haltiger Neurone zu sehen. CC=Crus cerebri.

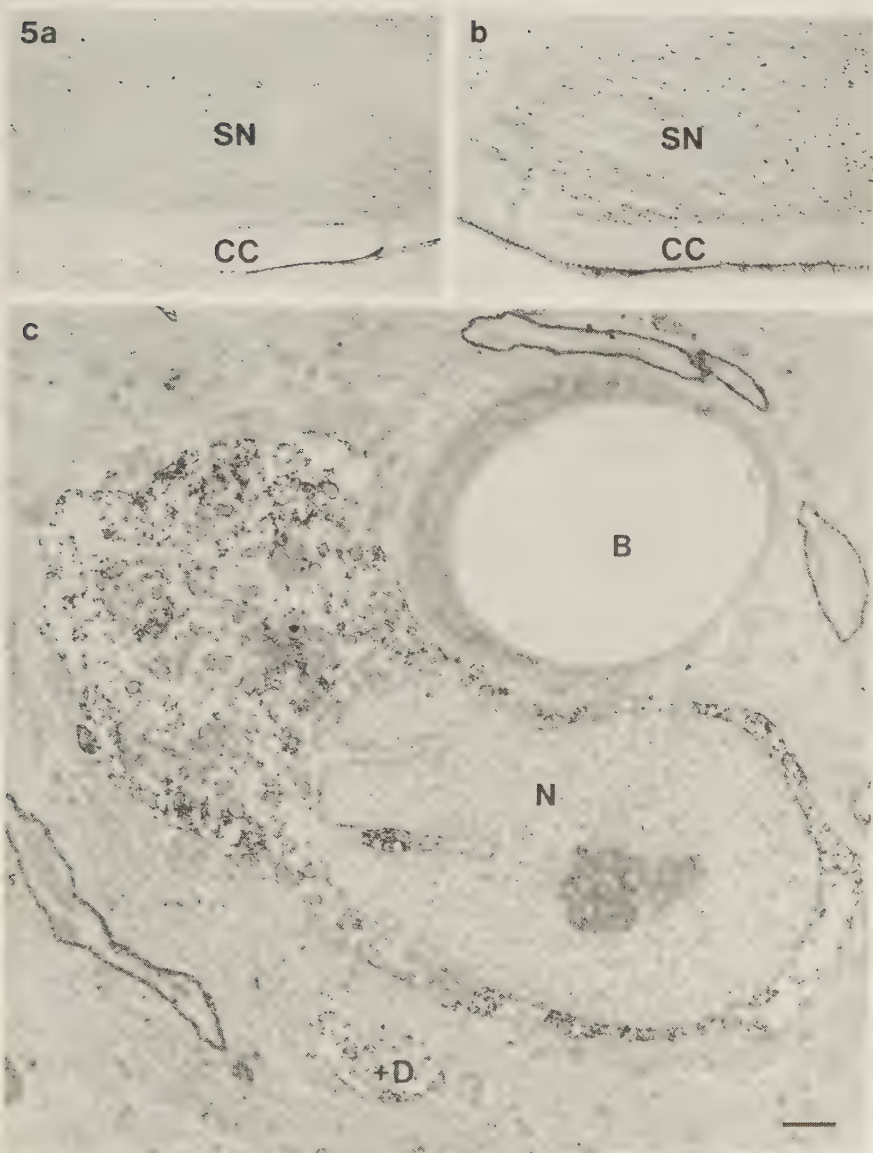
Vergrößerung 33x

Abb.5b: Nach ipsilateraler Colchizininjektion über der Substantia nigra führt die Unterbrechung des axonalen Transports zu einer Zunahme der GAD-Konzentration in Zellkörpern. In der sagittal geschnittenen Substantia nigra (SN) sind nach GAD/ABC-Immunreaktion deshalb zahlreiche kräftig gefärbte GAD-immunoreaktive Zellkörper zu sehen. Die Terminalfärbung bleibt unverändert. CC=Crus cerebri.

Vergrößerung 33x

Abb.5c: Ein GAD-immunoreaktives Neuron aus der Substantia nigra pars reticulata in Nachbarschaft zu einem Blutgefäß (B). Der exzentrische Zellkern (N) mit ausgeprägtem Nucleolus hat zwei deutliche Einschnürungen. Das dunkle Reaktionsprodukt befindet sich auch im benachbarten GAD-positiven Dendriten (+D) frei im Cytoplasma, um die Zellorganellen und an der Zellmembran.

Vergrößerung 9670x



Legende zu Abb.6

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Substantia nigra pars reticulata nach Immunreaktionen mit GAD- und GABA-Antisera.

Abb.6a: Ein GAD-immunoreaktiver Dendrit (+D) mit Reaktionsprodukt im Cytoplasma, an Mitochondrien und an der Teilungsbromast in Kontakt mit verschiedenen Sontons. Ein GAD-positiver Sonton (I) enthält immunreaktive Ablagerungen an pleomorphen Vesikeln. Die synaptische Kontaktzone wird beidseitig von Reaktionsprodukt maskiert, so daß ein symmetrischer Kontakt nicht eindeutig nachweisbar ist. Ein GAD-negativer Sonton (II) mit pleomorphen, z.T. auffallend länglichen Vesikeln bilden symmetrische Kontakte mit dem Dendriten. Ein Sonton mit runden Vesikeln ist nicht immunreaktiv (III). Sein synaptischer Kontakt ist postsynaptisch durch Reaktionsprodukt maskiert.

Vergrößerung 28350x

Abb.6b: Drei GAD-immunoreaktive Sontons (I) mit pleomorphen Vesikeln, an deren Oberfläche sich das Immunpräzipitat ebenso wie an Mitochondrien abgelagert hat, bilden symmetrische Kontakte mit einem nicht-immunreaktiven Dendriten (-D).

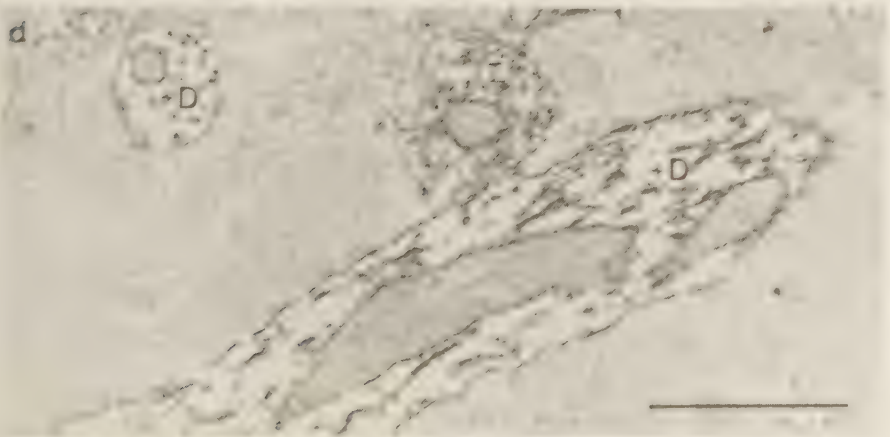
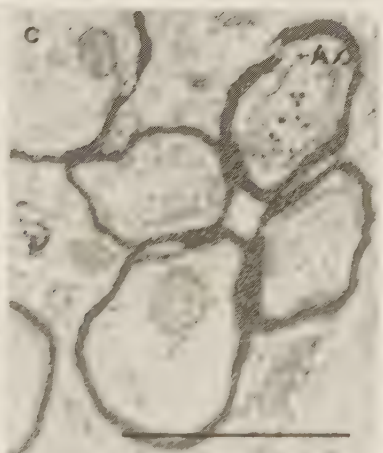
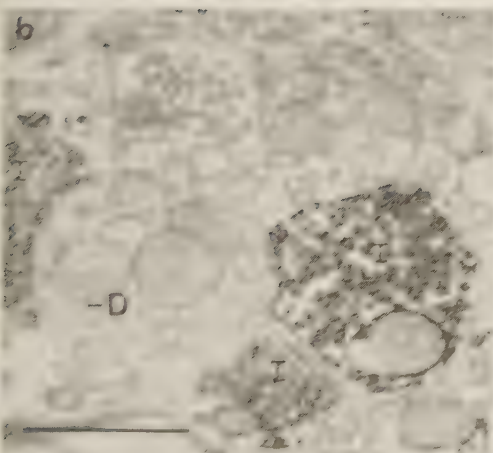
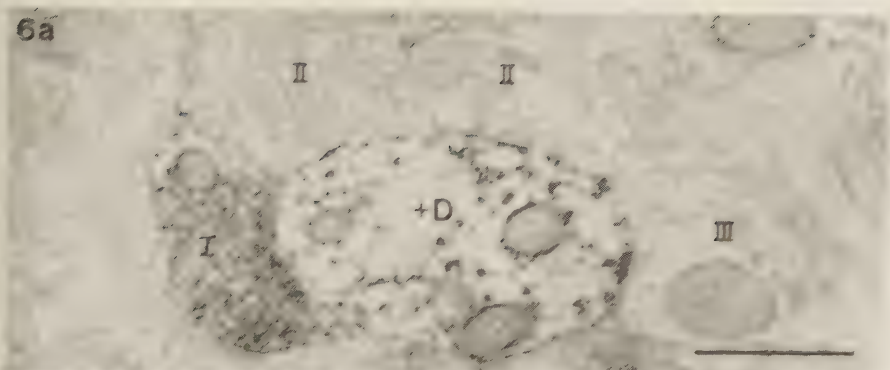
Vergrößerung 28350x

Abb.6c: Im Gegensatz zu GAD-Antiserum markieren GABA-Antikörper häufiger angeschnittene Axone. Ein GABAerges myelinisiertes Axon (+A) mit Reaktionsprodukt an Neurotubuli befindet sich in Nachbarschaft zu nicht-immunreaktiven myelinisierten Axonen in der SNr.

Vergrößerung 40000x

Abb.6d: Ein GABA-immunoreaktiver Sonton (I) mit pleomorphen Vesikeln in symmetrischem Kontakt mit einem längsgeschnittenen GABA-positiven Dendriten (+D). GABA-Antikörper markieren ebenso wie GAD-Antikörper Sontons mit pleomorphen Vesikeln und symmetrischen Kontakten. Im längsgeschnittenen Dendriten sind die Neurotubuli durch das abgelagerte Reaktionsprodukt hervorgehoben. Ein querschnittener GABA-positiver Dendrit (links oben, +D'), mit Reaktionsprodukt an querschnittenen Neurotubuli, zeigt die gleiche Verteilung des Immunpräzipitats.

Vergrößerung 35000x



Legende zu Abb.7

Die Substantia nigra pars reticulata 5 Tage nach Ibotensäureinjektion ins Striatum und 3 Tage nach Colchizininjektion in Höhe der Zona incerta.

Abb.7a: Lichtmikroskopische Aufnahme der Substantia nigra (SN) in einem sagittal geführten Vibratomschnitt mit zahlreichen intensiv gefärbten GAD-immunoreaktiven Zellkörpern und Dendriten bei nur geringer Terminalfärbung.

Vergrößerung 86x

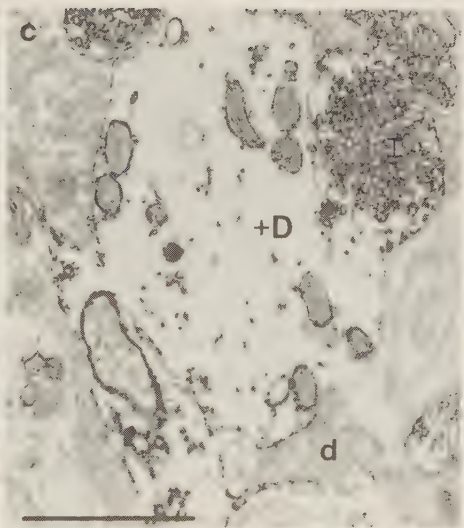
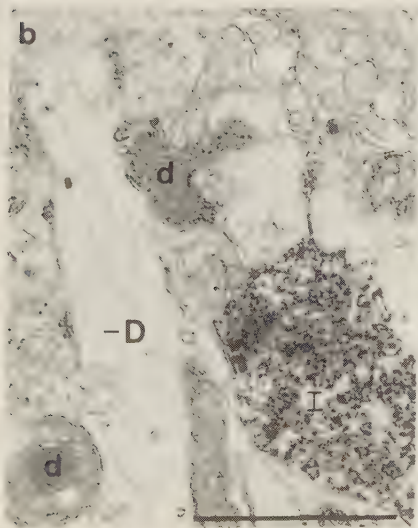
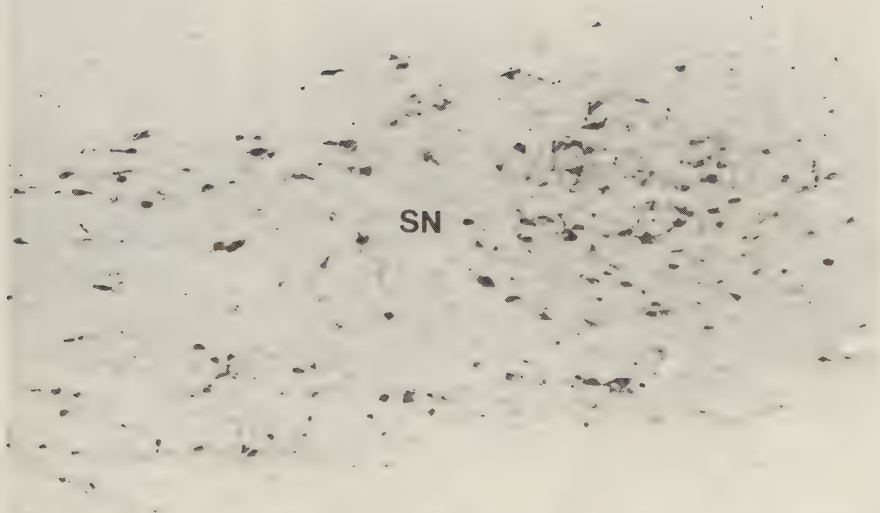
Abb.7b: Ein GAD-immunoreaktiver Bouton (I) mit pleomorphen Vesikeln und zwei degenerierte Boutons (d) mit undifferenziertem Inhalt in synaptischem symmetrischen Kontakt mit einem nicht-immunoreaktiven Dendriten (-D). Degenerierte Boutons in der SN sind auf Ibotensäure-geschädigte, striato-nigrale Projektionsneurone zurückzuführen.

Vergrößerung 35000x

Abb.7c: Ein GAD-positiver Bouton (I) hat ebenso wie ein nicht-immunoreaktiver Bouton symmetrischen Kontakt mit einem GAD-positiven Dendriten. Beide Boutons enthalten pleomorphe Vesikel. Ein degenerierter Bouton (d), mit ähnlich strukturlosem Inhalt wie die vergleichbaren Terminalen in Abb.7b, steht in Kontakt mit dem gleichen positiven Dendriten.

Vergrößerung 30000x

7a



Legende zu Abb.8

Substantia nigra pars reticulata, 40 Stunden nach prä-nigraler Hemitranssektion. Elektronenmikroskopische Ausschnitte aus Regionen mit zahlreichen degenerierten Boutons.

Abb.8a: Ein GAD-positiver (I) und ein degenerierter Bouton (d) in synaptischem Kontakt mit einem GAD-immunoreaktiven Neuron (+N). Die intensive Immunreaktion maskiert teilweise die pleomorphen Vesikel und den synaptischen Kontakt des positiven Boutons. Im Neuron umgibt das Reaktionsprodukt vor allem die Zisternen des endoplasmatischen Retikulums.

Vergrößerung 35000x

Abb.8b: Ein GAD-immunoreaktiver Bouton mit pleomorphen Vesikeln in symmetrischem Kontakt mit zwei gegenüberliegenden Dendriten, einem GAD-positiven (+D) und einem GAD-negativen (-D).

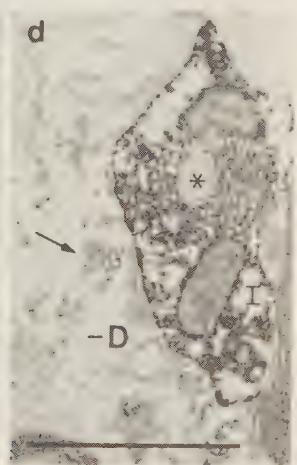
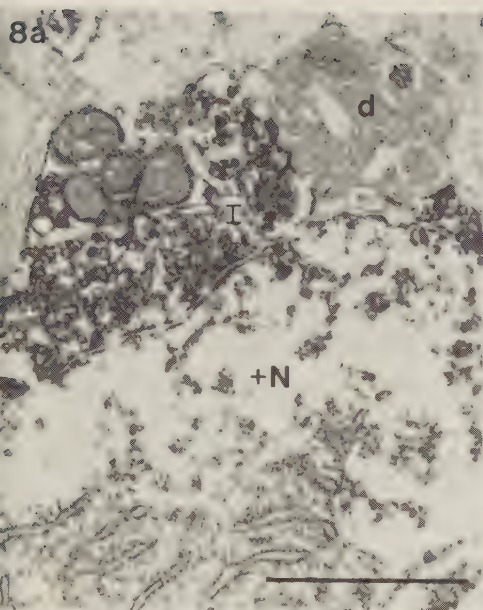
Vergrößerung 37500x

Abb.8c: Ein GAD-immunoreaktiver Bouton (I) mit pleomorphen Vesikeln in symmetrischem Kontakt mit einem GAD-negativen Dendriten (-D).

Vergrößerung 35000x

Abb.8d: Ein GAD-immunoreaktiver Bouton (I) in symmetrischem Kontakt mit einem GAD-negativen Dendriten (-D), der eine Ansammlung von synaptischen Vesikeln (Pfeil) in der Nähe des synaptischen Spalts enthält. *= Einstülpung eines dendritischen Dorns (spine) in den Bouton.

Vergrößerung 37500x



Legende zu Abb.9

Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Verteilung von Dynorphin A 1-17 und GAD in der Substantia nigra.

Abb.9a: Dynorphin-immunoreaktive Terminale im anterioren (a) und basalen (b) Bereich der Substantia nigra pars reticulata. Der sagittale Vibratomschnitt (ca.40 µm dick) zeigt nach der schwachen Immunreaktion mit der PAP-Methode die für Dynorphin gefundene, typische Verteilung.

p=posterior, SN=Substantia nigra

Vergrößerung 59x

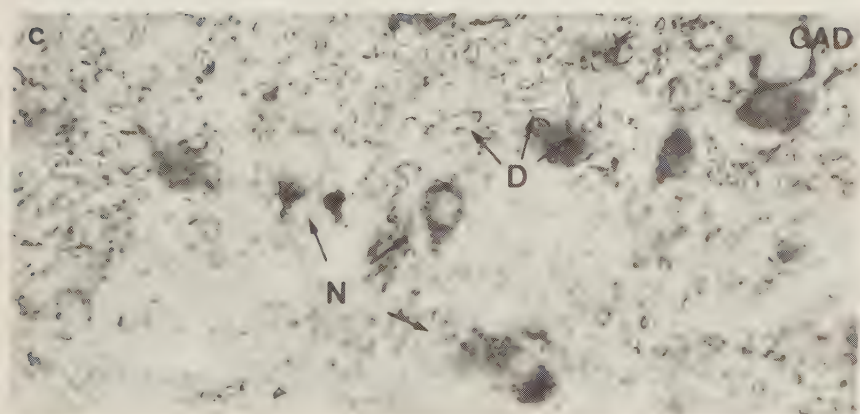
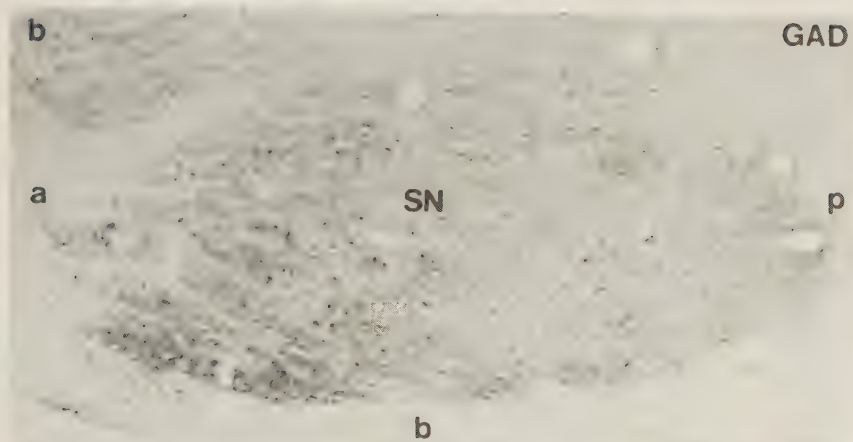
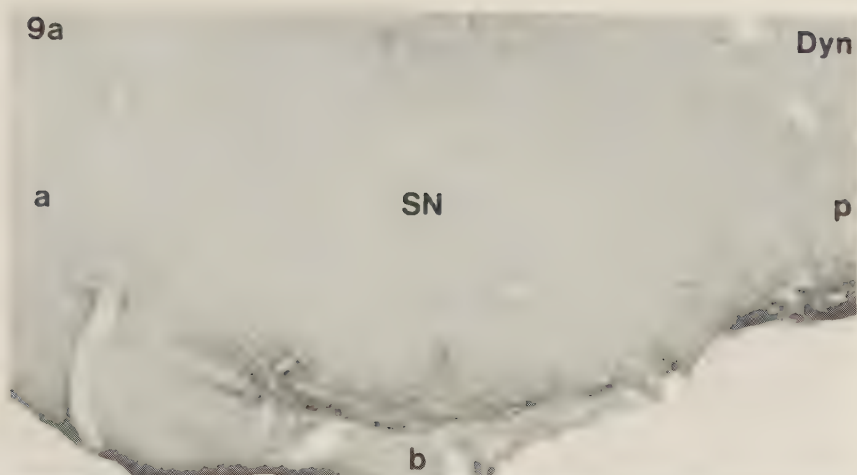
Abb.9b: Sagittaler Vibratomschnitt der Substantia nigra (SN) mit GAD/Streptavidin-Gold-Markierung und nachfolgender Silberintensivierung. Terminal- und Zellkörperfärbung ist über die gesamte Ausdehnung der SN nachzuweisen, nimmt aber an Intensität im anterio-basalen Teil zu.

a=anterior, b=basal, p=posterior

Vergrößerung 51x

Abb.9c: Lichtmikroskopischer Ausschnitt aus der Substantia nigra pars reticulata mit GAD/Streptavidin-Gold-Markierung und nachfolgender Silberintensivierung. Die silberintensivierten Goldpartikel markieren unterschiedlich intensiv Neurone (N) und GAD-positive Boutons. Nicht-immunoreaktive Dendriten (D) werden durch die Terminalfärbung sichtbar.

Vergrößerung 125x



Legende zu Abb.10

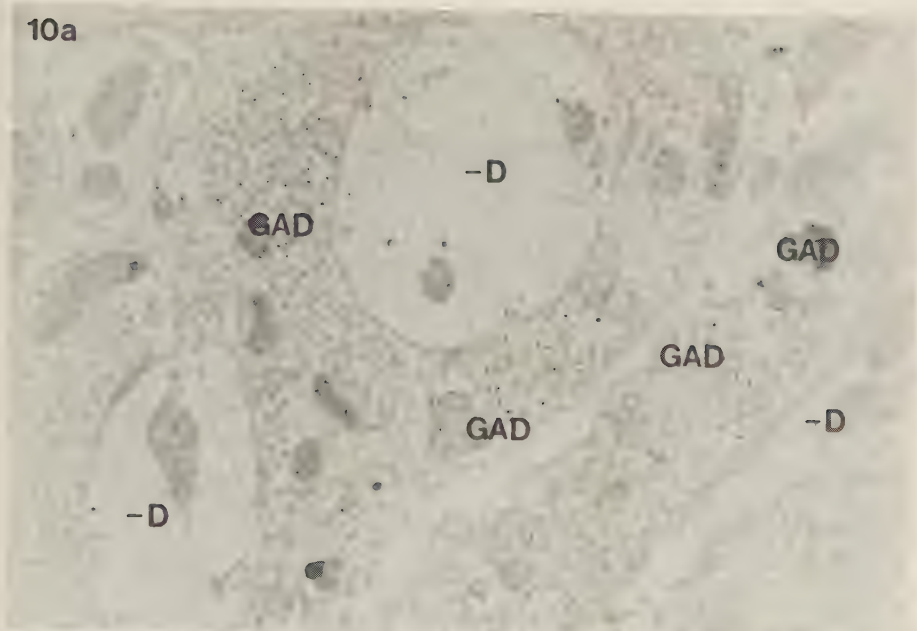
Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus der Substantia nigra pars reticulata nach GAD/Streptavidin-Gold-Markierung.

Abb.10a: Streptavidin-Gold-markierte GAD-immunoreaktive Boutons (GAD) mit den typischen pleomorphen Vesikeln und symmetrischen Kontakten an GAD-negativen Dendriten (-D). Die Goldpartikel sind fast ausschließlich an Vesikelmembranen gebunden.

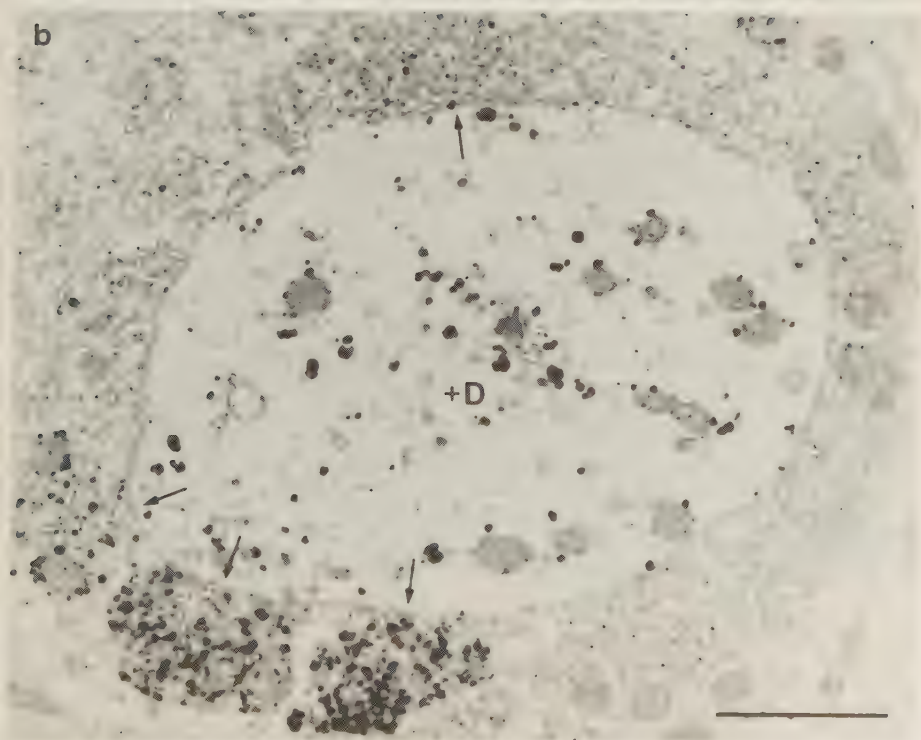
Abb.10b: Silberintensivierte Gold-Markierung im Ultradünnschnitt mit Kontakten typischer GAD-Boutons (Pfeile) an einem GAD-positivem Dendriten (+D). Die intensivierten Goldpartikel lagern sich im Dendriten an Cytoplasmaverdichtungen und Zellorganellen an. In Boutons führt die Silberintensivierung zur Maskierung der Vesikel und erschwert zusammen mit der deutlichen Verschlechterung des Gewebeerhalts eine genaue Bestimmung der Vesikelmorphologie.

Vergrößerung jeweils 30000x

10a



b



Legende zu Abb.11

Verschiedene dynorphinerge Boutontypen in der antero-basalen Substantia nigra pars reticulata, immunoreaktiv markiert mit der PAP-Methode.

Abb.11a: Dynorphin-immunoreaktiver Bouton (Dyn) mit einem nicht-immunoreaktiven, membranbegrenzten Vesikeleinschluß, pleomorphen Vesikeln und symmetrischem Kontakt an einem Dendriten (D).

Typ A der Klassifizierung.

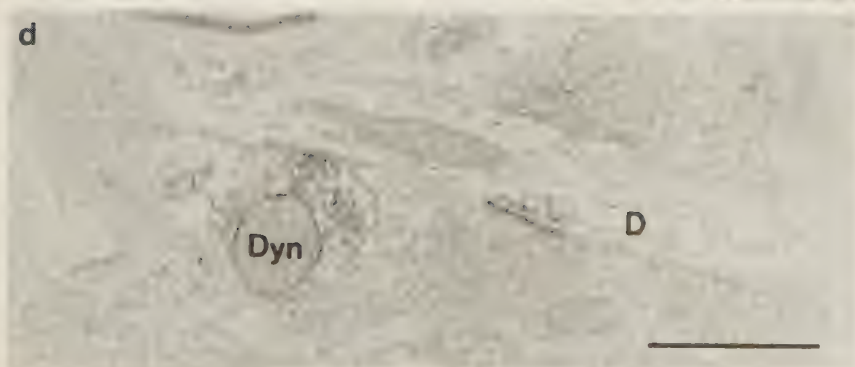
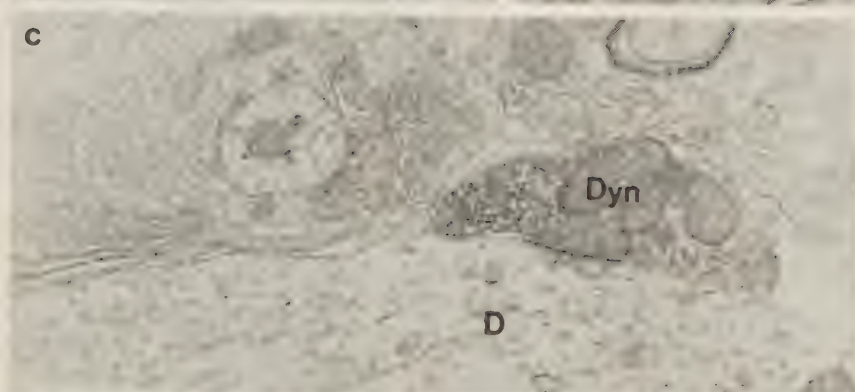
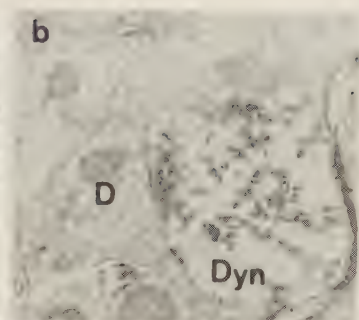
Abb.11b: Ein selten anzutreffender Dynorphin-haltiger Bouton (Dyn) mit runden, verstreuten Vesikeln und asymmetrischem Kontakt an einem Dendriten (D).

Abb.11c: Dynorphin-haltiger, langgestreckter Bouton (Dyn) mit kleinen, überwiegend runden Vesikeln und ausgedehntem asymmetrischem Kontakt an einem Dendriten (D). Die Vesikel der benachbarten nicht-immunoreaktiven Boutons sind deutlich größer und pleomorph.

Typ B der Klassifizierung

Abb.11d: Vereinzelt vorkommender Dynorphin-haltiger Bouton (Dyn) mit sehr kleinen, pleomorphen Vesikeln und asymmetrischem Kontakt an einem Dendriten (D). Auch in diesem Beispiel sind die Vesikel der benachbarten nicht-immunoreaktiven Boutons z.T. wesentlich größer.

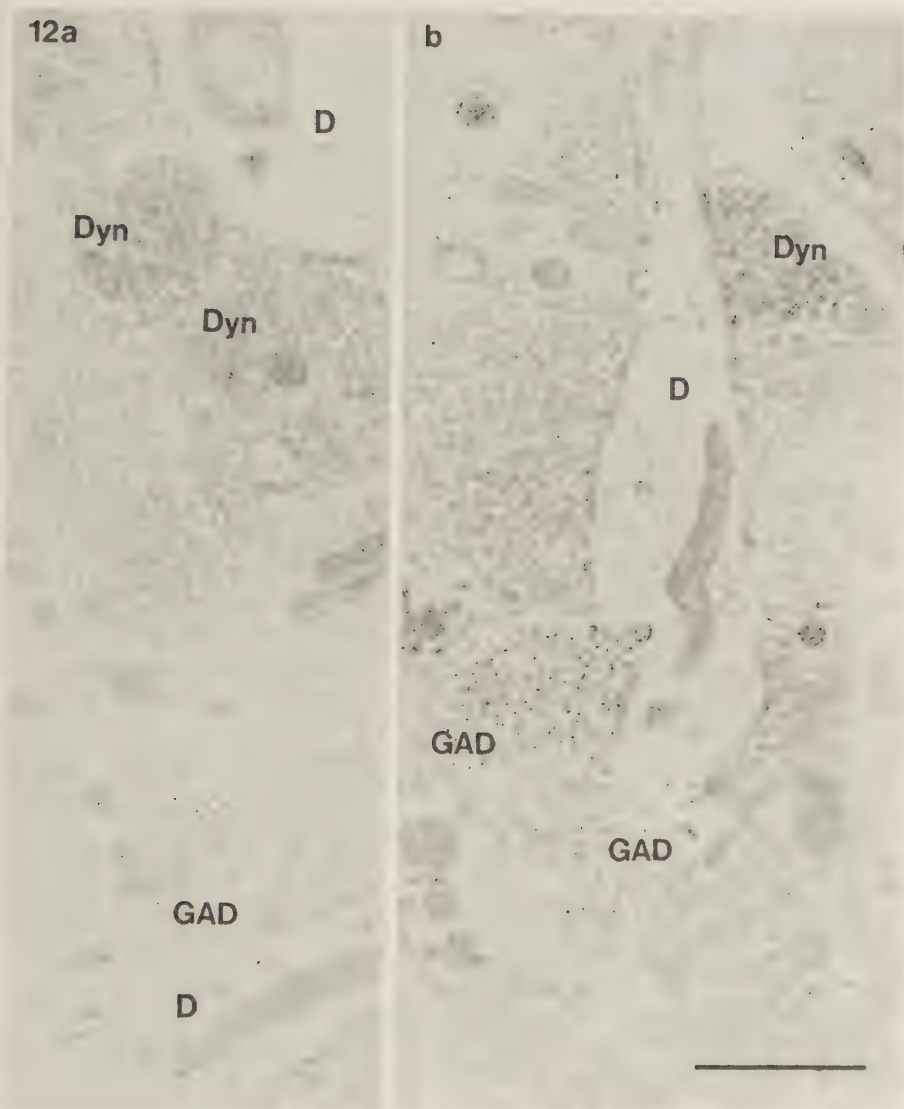
Vergrößerung jeweils 30000x



Legende zu Abb.12

Dynorphin (Dyn)- und GAD-immunoreaktive Boutons in der anterio-basalen Substantia nigra pars reticulata nach doppelimmuncytochemischer Markierung. Sowohl Streptavidin-Gold-markierte GAD-Boutons als auch Dynorphin A/PAP markierte Terminale (Typ A der Klassifizierung) weisen die gleichen Charakteristika auf: pleomorphe Vesikel gleicher Größe und symmetrische synaptische Kontakte. Trotz des gleichen Boutontyps sind GAD und Dynorphin nicht koexistent nachzuweisen. GAD-haltige und dynorphinerge Terminale bilden in seltenen Fällen Kontakte mit den gleichen (Abb.12b), häufiger mit verschiedenen Dendriten (D; Abb.12a). In den meisten Fällen sind GAD-Boutons von Dynorphin-Boutons räumlich getrennt.

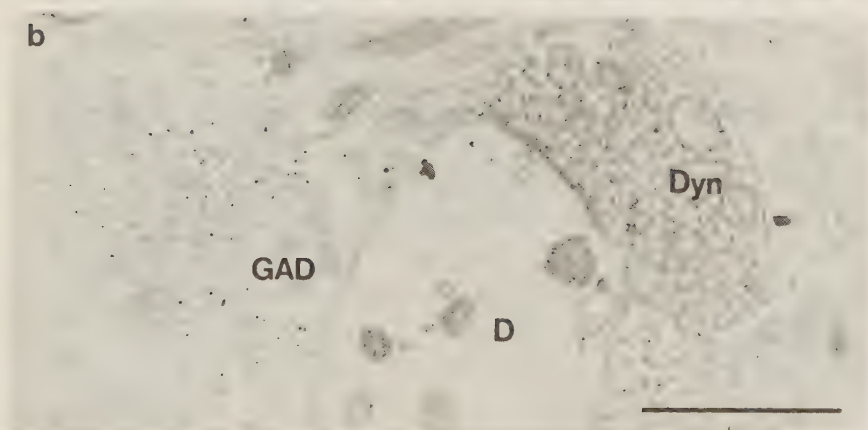
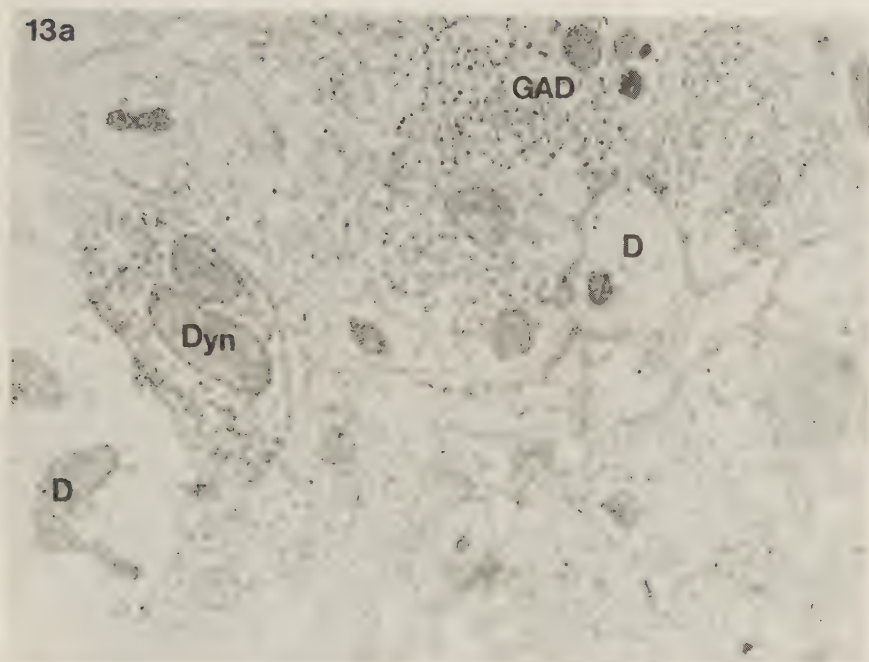
Vergrößerung 30000x



Legende zu Abb.13

Dynorphin-haltige, langgestreckte Boutons (Dyn) in der anterio-basalen Substantia nigra pars reticulata mit kleinen runden oder pleomorphen Vesikeln und asymmetrischen Kontakten (Typ B der Klassifizierung) an Dendriten (D), selten benachbart zu einem GAD-haltigen Bouton (GAD) am gleichen Dendriten (Abb.13b). Auch in dieser Doppelfärbung finden sich die bereits charakterisierten, unterschiedlichen Boutontypen wieder. Sie sind, wie die GAD- und Dynorphin-Boutons in Abb.12, zumeist räumlich getrennt. Das PAP-Reaktionsprodukt in den Dynorphin-Boutons ist wie in Abb.12 durch die langen Inkubationszeiten etwas ausgewaschen.

Vergrößerung 35000x



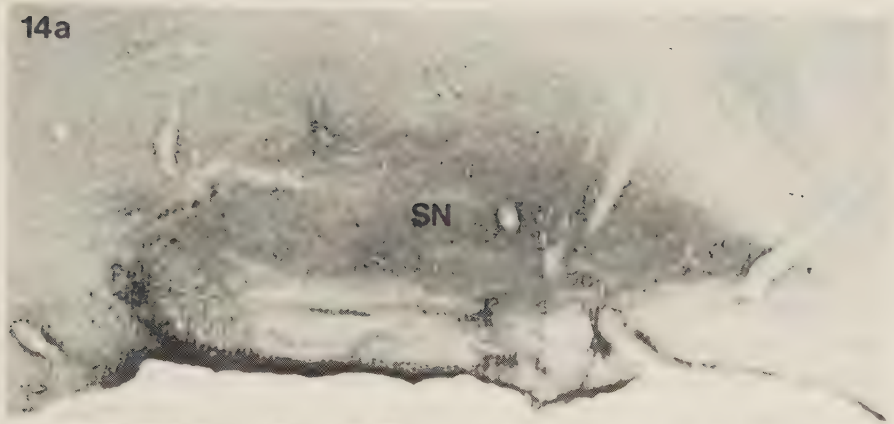
Legende zu Abb.14

Abb.14a: Sagittaler Vibratomschnitt durch die Substantia nigra (SN) einer unbehandelten Gehirnhälfte nach GABA/PAP-Immunreaktion. Neben einer deutlichen Terminalfärbung sind nur wenige, sehr schwach markierte Zellkörper zu sehen.
Vergrößerung 52x

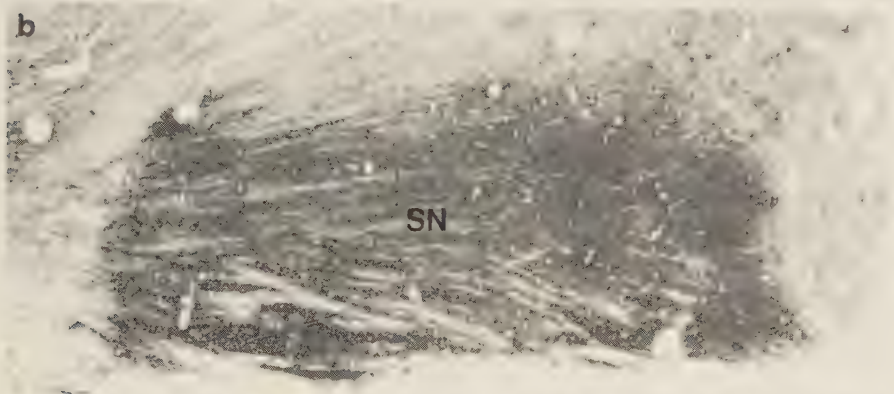
Abb.14b: Sagittaler Vibratomschnitt durch die Substantia nigra (SN) des gleichen Tieres nach GABA/PAP und GAD/Streptavidin-Gold-Markierung mit nachfolgender Silberintensivierung. Trotz zunehmender Hintergrundfärbung ist die SN deutlich und verstärkt mit beiden Methoden markiert.
Vergrößerung 52x

Abb.14c: Ultradünnschnitt der Substantia nigra pars reticulata nach GABA/PAP und GAD/Streptavidin-Gold-Markierung mit nachfolgender Silberintensivierung. Ein Bouton mit symmetrischem Kontakt (Stern) an einem GAD-positiven Dendriten (+D) enthält Reaktionsprodukt der GABA/PAP-Immunreaktion und silberintensivierte Goldkörner der GAD-Markierung. Die PAP-Immunreaktion und der Gewebeerhalt wird durch die Silberintensivierung verschlechtert.
Vergrößerung 27500x

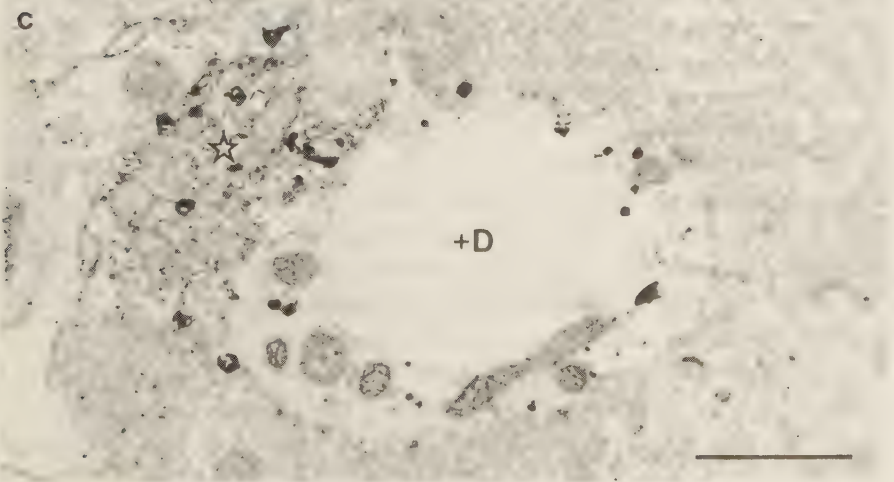
14a



b



c



4. DISKUSSION

4.1. Colchizin

Das nichtselektive Neurotoxin Colchizin, ein Alkaloid der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale* L.), bindet an Tubulin und hemmt den neuronalen Transport (Dasheiff and Ramirez, 1985). Diese Wirkung auf den axonalen Transport ist wiederholt zur Akkumulation von Proteinen und transmitterhaltigen Zellorganellen bei unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt worden (Dahlström, 1968; Hökfelt and Dahlström, 1971; Flament-Durand and Dustin, 1972; Ribak et al., 1978; Dube and Pelletier, 1979). Flament-Durand and Dustin (1972) finden bei einer Menge von 200 µg Colchizin pro intraventrikulärer Injektion keine Veränderungen an Neurotubuli, Neurofilamenten, Glia und Zellorganellen. Die Synthese-Aktivität des untersuchten paraventrikulären Nukleus der Ratte war ebenfalls unverändert. Nach Dasheiff and Ramirez (1985) zerstört eine Dosis von 0,25 µg Colchizin im Gyrus dentatus bei der Ratte die Körnerzellen im Radius von 100 µm um die Injektionsstelle. Das Ausmaß des Zellschadens nimmt mit steigender Dosis zu. Ribak et al. (1978) unterbrechen den axonalen Transport mit Colchizin-Injektionen (10 µg/µl), um den Abtransport von GAD in Axonterminale zu verhindern und damit die Immunreaktivität dieses Enzyms in neuronalen Somata zu erhöhen. Dabei konnte ausgeschlossen werden, daß der dem Colchizin zugeschriebene Effekt auf eine induzierte, erhöhte Membranpermeabilität oder mechanische Einflüsse bei der Injektion (2-5 µl) zurückzuführen war. In Anlehnung an Ribak et al. (1978) war bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten durch das lange immunocytochemische Verfahren mit seinen negativen Einflüssen auf den Strukturerehalt keine zusätzliche, eindeutige Colchizinwirkung auf das Hirngewebe nachzuweisen. Um die mechanische Schädigung des Gewebes möglichst einzuschränken, wurde das Injektionsvolumen auf 0,5 µl

festgesetzt. In keinem Fall wurden bei Kontrollen dunkle Boutondegenerationen nach Colchizininjektionen gefunden.

4.2. Ibotensäure

Ibotensäure, eine Substanz aus dem Fliegenpilz *Amanita muscaria* (Eugster, 1968), ähnelt sowohl in der Molekülstruktur als auch in der neuroexcitatorischen Wirkung der L-Glutaminsäure (Schwarcz et al., 1979). Muscimol, das Decarboxylierungsprodukt der Ibotensäure, ist ein häufig verwendeter Agonist des inhibitorischen Transmitters GABA (Krogsgaard-Larsen, 1978).

Intrastriatale Injektionen von nanomolaren Ibotensäuremengen (10 µg in 1 µl) führten zu begrenzten, spezifischen Läsionen: Neuronale Zellkörper degenerierten, mit Ausnahme von großen, möglicherweise Acetylcholin-haltigen Nervenzellen (Köhler and Schwarcz, 1983), während myelinisierte, durchziehende Fasern, Nervenendigungen extrinsischer Neurone und Gliaelemente unbeeinflusst blieben. Von der Injektionsstelle entfernter gelegene, extrastriatale Läsionen wurden nicht gesehen (Schwarcz et al., 1979). Die Größe der Ibotensäureläsion ist abhängig von injiziertem Volumen und verabreichter Dosis. Erst über der Schwellendosis von etwa 3 µg zeigt Ibotensäure degenerative Wirkung bei Striatumneuronen (Köhler and Schwarcz, 1983). Die excitatorisch-toxische Wirkung von Ibotensäure bei Vertebraten ist auf eine postsynaptische Bindung zurückzuführen. Die deutliche Depolarisation nach Ibotensäuregabe beginnt langsamer und ist dauerhafter im Vergleich zu Glutamat (Johnston et al., 1968). Glutamat-Rezeptoren und Ibotensäurebindungsstellen sind identisch (Schwarcz et al., 1979). Der genaue degenerative Wirkungsmechanismus von Ibotensäure ist nicht geklärt.

4.3. Spezifität der immuncytochemischen Methode

Die erfolgreiche immuncytochemische Lokalisation einer Gewebskomponente ist abhängig von

1. der Gewebsbehandlung einschließlich Fixierung, Einbettung und Schneiden,
2. der Behandlung der Gewebsschnitte mit Antiseren unterschiedlicher Konzentration und Dauer,
3. der Visualisierung der immunologisch gebundenen primären Antikörper.

Jeder Schritt einer immuncytochemischen Methode kann zu einer unspezifischen Reaktion beitragen und damit zu einer anderen als der erwarteten selektiven Antigen-Antikörper-Reaktion führen. Es ist deshalb nötig, die Spezifität eines jeden Schrittes zu testen. Aber auch nach allen möglichen Spezifikationstests kann eine spezifische Färbung nur mit einiger Sicherheit angenommen werden, sie ist damit nicht erwiesen.

Unspezifische Färbung in der Immuncytochemie läßt sich in zwei prinzipielle Gruppen einteilen (Sternberger, 1979): Serum- oder Antikörperunspezifität ist hauptsächlich bedingt durch kreuzreagierende Antikörper, während die Methodenunspezifität alle nicht-immunologischen Reaktionen während des immunhistochemischen Markierungsablaufs erfaßt.

4.3.1. Fixierung

Ein ideales Fixativ für immuncytochemische Techniken sollte durch schnelle Bindung das Auswaschen des gesuchten Antigens verhindern, die Feinstruktur des empfindlichen Gehirngewebes erhalten und gleichzeitig gewährleisten, daß der antigene und biochemische Charakter der gesuchten Peptide und Proteine nicht verlorenght. Durch die oft tagelangen Inkubationen mit verschiedenen Antiseren ist besonders

bei pre-embedding Techniken die Verhinderung mechanischer und degenerativer Veränderungen der Feinstruktur, vor der Nachfixierung mit Osmiumtetroxid, sehr wichtig.

Die verbreitetsten Fixative Formaldehyd und Glutaraldehyd sind in der Kombination ihrer Vorteile, ursprünglich nach Karnovsky (1965), für die meisten Fragestellungen gut geeignet. Durch die beiden reaktiven Aldehydgruppen pro Molekül bildet Glutaraldehyd innerhalb weniger Stunden stabile Proteinverbindungen, während Formaldehyd, mit nur einer Aldehydgruppe pro Molekül, schneller als Glutaraldehyd penetriert (Gosselin, 1986) und Strukturen vorläufig stabilisiert. Zwar ist Glutaraldehyd durch die gute Bewahrung der Ultrastruktur praktisch unentbehrlich für elektronenmikroskopische Untersuchungen, aber gleichzeitig auch ein limitierender Faktor für den Erhalt der biochemischen Eigenschaften der antigenen Determinanten. Eine starke, lang andauernde Glutaraldehydfixierung hat in der Regel eine genaue Lokalisierung des Antigens zur Folge, bei geringer Intensität der Immunfärbung; während eine schwache, kurze Glutaraldehydfixierung zu einer diffusen, aber intensiven Immunfärbung führt (Hayat, 1986). Dieses Problem des Kompromisses zwischen Fixierung und Erhalt der Tertiärstruktur des Proteins ist bei jedem Antigen individuell zu handhaben. Einerseits konnten schon 0,5% Glutaraldehyd im Fixativ eine Immunreaktion unterdrücken (Gosselin, 1986; Anthony, 1986), andererseits erhielt 4% Glutaraldehyd die Immunoreaktivität von Dynorphin im Rattenhirngewebe (Whitnall et al., 1985), während TSH-Immunfärbung im rER nur nach Glutaraldehydfixierung möglich war (Childs, 1982).

Für die vorliegende Arbeit wurde routinemäßig ein Gemisch aus 4% Paraformaldehyd mit 0,1-0,2% Glutaraldehyd bei pH 7,4 verwendet, das Ansprüche an Ultrastruktur und Immunoreaktivität weitgehend erfüllte. Allerdings wurde darauf geachtet, stets frische Formalinlösung zu nehmen, um der Bildung von Ameisensäure entgegenzuwirken, die zu einem pH-Abfall und schlechter Fixierung führen würde (Gosse-

lin,1986). Die Anzahl der verfügbaren Aminogruppen in Proteinen ist bei der Glutaraldehyd-Reaktion primär abhängig vom pH-Wert. Der optimale pH-Wert führt zum gewünschten Fixierungsgrad ohne die antigenen Eigenschaften zu beeinflussen. In der Regel liegt er zwischen 6,8 und 7,5 (Hayat,1986).

Die Lösungen wurden mit depolymerisiertem Paraformaldehyd angesetzt, weil kommerziell verfügbare Formalinlösungen Methanol und Stabilisatoren enthalten, die die Immunreaktivität der Gewebsantigene negativ beeinflussen (Eckert and Ude,1983). Unvollständig im Gewebe gebundene Glutaraldehydmoleküle können mit reaktiven Aminogruppen der immuncytochemischen Reagentien reagieren (van Leeuwen,1986). Die Hirne wurden aus diesem Grund mit Fixativ II (ohne Glutaraldehyd) gründlich nachperfundiert, sowie vor und während des Vibratomschneidens in TBS gewaschen.

Die Nachfixierung mit dem nur langsam penetrierenden Osmiumtetroxid läßt durch die Schwermetallbindung besonders die Lipide und damit die Membranen der Zellen kontrastreich hervortreten. Eine post-embedding-Markierung (s.Anhang) ist mit vielen Antikörpern dann jedoch nicht mehr möglich (Whitnall et al.,1985; Bendayan and Zollinger,1983). Trotz des schlechteren Gewebeerhalts wurden alle post-embedding-Experimente deshalb an Schnitten gemacht, die weder mit Osmium fixiert noch mit Uranylacetat kontrastiert waren.

4.3.2. Präinkubierung

Vor der immuncytochemischen Prozedur kamen die Vibratomschnitte in eine 1%ige Natriumborohydrid-Lösung, um die restlichen freien Aldehydgruppen des Glutaraldehyds zu blockieren (Lillie and Pizzolato,1972). Auch die Präinkubierung der Schnitte mit Serum, das nicht von Immunreagentien erkannt wird (Sternberger,1979), und die Verwendung von Lysin, mit reaktiven Aminogruppen, diente diesem Zweck

(van Leeuwen, 1986).

Die endogene Peroxidase des Gewebes wurde mit einer Mischung aus 10% Methanol und 3% Wasserstoffperoxid in TBS blockiert (Streefkerk, 1972; Oertel et al., 1982b). Pseudoperoxidase-Aktivität, wie sie von Hämgruppen der Erythrozyten beschrieben wurde (Streefkerk, 1972), kann auf die gleiche Weise verhindert werden. Bei sorgfältiger Perfusionsfixierung fiel sie lediglich im Bereich des Injektionskanals auf, wo sie auf geringfügige Einstichblutungen zurückzuführen war.

Die Bindung von Immunglobulinen an Zellgewebe durch Ioneninteraktion kann mit zwei Maßnahmen verhindert oder größtenteils reduziert werden (Grube, 1980):

1. Die Antiseren werden mit Puffer bei erhöhtem pH-Wert von 8,6 verdünnt. Das entspricht einem Wert nahe dem isoelektrischen Punkt des IgG, d.h. die Moleküle erscheinen nach außen hin ungeladen.
2. Der verwendete Puffer erhält einen Zusatz von 0,5 M NaCl zur Erhöhung der Ionenkonzentration.

Ein Zusatz von 0,5 M NaCl im verwendeten Puffer und eine Erhöhung des pH-Wert auf 8,6 hatte lediglich beim Dynorphin-Antikörper eine intensivere spezifische Immunreaktion zur Folge. Das GAD-Antiserum hatte einen hohen Titer und wurde mit niedrigen Konzentrationen benutzt, so daß Ioneninteraktionen wenig Einfluß haben konnten.

Auch die positive Ladung des Avidins (isoelektrischer Punkt = 10) bei neutralem pH-Wert, die eine Bindung an negativ geladene Nukleinsäuren oder Phospholipide erleichtern sollte, führte nicht zu unspezifischer Färbung z.B. der Zellkerne oder Zellmembranen.

Hydrophobe Interaktionen entstehen, wenn sich hydrophobe Abschnitte in Antikörpermolekülen mit hydrophoben Teilen von Gewebskomponenten verbinden. Sie können durch Verwendung von Detergentien wie Triton X-100 abgeschwächt werden (van Leeuwen, 1986). Die dadurch hervorgerufene Verschlech-

terung der Ultrastruktur wird oft in Kauf genommen, weil Detergentien die Penetration von Antiseren ins Gewebe begünstigen. Es darf aber nicht übersehen werden, daß es mit Triton X-100 zur verstärkten Diffusion der antigenen Komponenten und damit zum Verschwinden der Immunreaktivität oder Ausbreitung auf benachbarte, nicht immunoreaktive Strukturen kommen kann (Arluison et al., 1983). Aus diesen Gründen wurde auf Detergentien verzichtet.

Eine besondere unspezifische Färbung wurde bei neuralem Gewebe mit der Avidin-Biotin-Methode beschrieben (Naritoku and Taylor, 1982). Der vermutete Grund ist die Bindung des Glykoproteins Avidin an Lektin. Naritoku and Taylor (1982) erzielten eine deutliche Abschwächung dieser unspezifischen Färbung durch 60minütige Präinkubierung der Schnitte mit 0,05 M α -methyl-D-mannoside. In den hier vorliegenden Experimenten wurde mit dem Verfahren keine Reduzierung der Hintergrundfärbung erreicht.

Die endogene Biotinaktivität ist von gewisser Bedeutung nur bei Geweben wie Leber, Milchdrüsen, Fettgewebe und Nieren, die über einen ausreichenden Biotingehalt verfügen, um eine unspezifische Konjugatanhaftung zu bewirken (Wood and Warnke, 1981).

4.4. Serumspezifität

Die Reinheit des Immunogens zur Produktion von spezifischen Antikörpern ist ebenso wichtig wie die des Antikörpers zur Lokalisation eines Antigens im Gewebe. Beim nicht-kommerziellen Antikörper gegen GAD sind die Präparationsschritte durch die genaue Beschreibung (Oertel et al., 1981a) verlässlicher für die Beurteilung unspezifischer Immunreaktionen als bei manchen kommerziellen Antiseren.

4.4.1. Was macht Antikörper selektiv ?

Die Bindungsstellen von Immunglobulinen variieren in der Aminosäuresequenz der variablen Regionen sowohl bei den "schweren" wie bei den "leichten" Ketten. Jede Plasmazelle eines bestimmten Klons produziert ein Immunglobulin mit einer einheitlichen Aminosäuresequenz in nebeneinanderliegenden Regionen von schweren und leichten Ketten. Diese einheitlichen Sequenzen bilden ein spezifisches Muster, das streng an eine komplementäre Konfiguration binden kann, die einen Umfang von etwa 2-8 Aminosäuren hat. Im Falle der Peptide oder Proteine gilt: je länger die Aminosäuresequenz der Region ist, die an das Immunglobulin bindet, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Selektivität des Antikörpers. Kurze Sequenzen von 1-3 Aminosäuren kommen in vielen Proteinen vor, während längere Sequenzen nicht so häufig sind oder sogar einzigartig auftreten.

4.4.2. Kreuzreaktionen

Ein Antiserum ist spezifisch, wenn es nur mit den antigenen Determinanten reagiert, gegen die es gerichtet ist. Eine antigene Determinante kann jedoch von verschiedenen Antikörpern erkannt werden, wenn sie in unterschiedlichen Antigenen vorliegt. Diese kreuzreagierenden Antikörper, die sich mit einem Antigen verbinden können, das nicht ihre Produktion stimuliert hat, erkennen möglicherweise nicht den Unterschied z.B. zwischen Ocytocin und Vasotocin. Beide Moleküle unterscheiden sich in einer einzigen Aminosäureposition, die nicht in der gemeinsam erkannten Determinanten liegen muß (van Leeuwen, 1986). Es ist deshalb von großem Vorteil, wenn man über physiologische und biochemische Informationen zur Verteilung und An- und Abwesenheit des gesuchten Antigens im Gewebe verfügt. Die Verteilung der Immunfärbung in einem Hirnschnitt gibt als Kontrollwert die

bisher bekannte Verteilung des vermuteten Transmitters wieder und liefert gleichzeitig mögliche neue Erkenntnisse.

4.4.3. Einfluß der Verdünnung des primären Antiserums

4.4.3.1. Kontaminierende Antikörper

Von großer Bedeutung für die Einschätzung der Qualität eines Antiserums ist die Spezifität der Färbung in Abhängigkeit von der Verdünnung. Neben der spezifischen Antikörperpopulation enthält das primäre Antiserum kontaminierende Antikörper. Alle können immunologisch oder nicht-immunologisch ans Gewebe binden und sind deshalb in der Lage, unspezifische Bindungen zu induzieren (Flucher, 1984). Weil der Titer dieser Antikörper oft keinen hohen Wert erreicht, ist ihr Einfluß auf die spezifische Färbung bei stark verdünnten Antiseren nicht sehr groß (Sternberger, 1979).

4.4.3.2. Bigbee-Effekt bei der indirekten PAP-Methode

Seine Bivalenz erlaubt dem Brückenantikörper (= 2.AK) sowohl die Bindung des primären Antikörpers als auch des PAP-Komplexes. Eine Markierung kann nur stattfinden, wenn das 2.Fab-Element des primär gebundenen 2.AK mit einem PAP-Molekül reagieren kann. Um diese Möglichkeit zu schaffen, muß das Brückenantiserum konzentrierter eingesetzt werden als das primäre Antiserum. Der Überschuß verhindert, daß beide Fab-Elemente eines Moleküls von primären Antiserummolekülen gebunden und inaktiviert werden (Bigbee et al., 1977).

Eine Verdünnung des sekundären Antikörpers auf 1:50 und der primären Seren auf 1:2000 (GAD), 1:1000 (Dynorphin A) und 1:6000 (GABA) brachte bei den hier beschriebenen Experimenten die besten Ergebnisse.

Nach Auffassung von Bigbee et al. (1977) sind alle linear verdünnungsabhängigen Immunreaktionen als unspezifisch anzusehen.

4.4.4. Komplementbindung

Die Reaktion des Komplement-Enzymsystems mit Antigen/Antikörper-Komplexen kann in Abhängigkeit von Reinheitsgrad und Verdünnung des Antiserums zu unspezifischer Hintergrundfärbung führen. Eine Erhitzung der benutzten Seren über 30 min bei 56°C hatte jedoch keinen Einfluß auf die Hintergrundfärbung.

4.4.5. Verwendung von Fab-Fragmenten

Die meisten Antikörpermoleküle sind bei konventionellen Brückenantisera gegen die Fc-Determinanten anderer IgG-Moleküle gerichtet (Sternberger, 1979). Sie sind aber in der Lage sowohl die schweren als auch die leichten Ketten eines immunogenen IgG's zu erkennen und reagieren deshalb auch mit Fab-Regionen. Bei Verwendung von Fab-Fragmenten nicht nur als primäre Antikörper verbessert sich nach Untersuchungen von Brandon (1985) die Eindringtiefe durch Überwindung sterischer Hindernisse und die Hintergrundfärbung geht zurück. Zu beachten ist jedoch die Möglichkeit von Fehlinterpretationen aufgrund unterschiedlicher Verteilung der Immunfärbung bei Fragmenten oder ganzen IgG-Molekülen (Riesenberg et al., 1984). Vor allem bei quantitativ-vergleichenden Untersuchungen sollten Fab-Fragmente deshalb nicht eingesetzt werden.

4.5. Spezifikations-tests am Gewebeschnitt

Polyclonale Antikörper werden kaum "monospezifisch" sein. Durch die Kombination von Separations- und Adsorptionstechniken können sie jedoch oft genau charakterisiert werden. Die unspezifische Adsorption von Antikörpern an Gewebeschnitten und das Auftreten von Kreuzreaktionen sind die häufigste Ursache von Fehlinterpretationen. Um sie zu vermeiden werden in der Regel folgende Kontrollexperimente gemacht:

4.5.1. Spezifitätskontrollen

Die Inkubierung des Antiserums mit dem Antigen unter experimentellen Bedingungen ist die verbreitetste Spezifitätskontrolle. Dabei wird ein Antiserum über Nacht bei 4°C mit dem Antigen inkubiert. Es bilden sich unlösliche Immunkomplexe, die nicht mehr in der Lage sind, die Gewebsantigene zu markieren. Nach der Inkubierung mit dem adsorbierten Antiserum dürfen die Schnitte keine Färbung mehr aufweisen (van Leeuwen, 1986). Wenn diese theoretische Vorgabe tatsächlich eintritt, sind folgende Gründe anzunehmen:

1. Der verwendete Antikörper gegen das gewebsgebundene Antigen ist spezifisch.
2. In Abhängigkeit vom Reinheitsgrad des adsorbierten Antigens werden Antikörper, die bereits durch Verunreinigung des injizierten Antigens im Tier induziert wurden, ebenfalls dem Serum entzogen und folglich nicht registriert. Daraus folgt: Die Färbung durch gewebskontaminierende Antikörper wird unwahrscheinlicher, je sauberer das verwendete Antigen war.

Wenn das Antiserum bei richtig ausgeführter Adsorption weiterhin reaktiv ist, war entweder der verwendete Antikörper gegen das gewebsgebundene Antigen nicht spezifisch oder das primäre Antiserum enthielt kontaminierende Antikörper. Die-

se beiden Möglichkeiten können im Negativtest unterschieden werden.

Der GAD-Antikörper erschien hinreichend charakterisiert durch die Arbeit von Oertel et al. (1981a). Der Dynorphin-Antikörper aus dem Labor von A. Herz, MPI Martinsried, zeigte keine Kreuzreaktionen mit α - und β -Nocodorphin, β -Endorphin und Leu-Enkephalin. Ein weiteres Qualitätskriterium war die reproduzierbare, präzise Markierung der Dynorphinhaltigen Moosfaserendigungen in der CA3-Region des Hippocampus (Nitsch et al., 1985).

4.5.2. Negativkontrolle

Wenn nach Inkubierung mit adsorbiertem Antiserum eine Immunreaktion stattfindet, kann der Austausch gegen Normalserum im immunocytochemischen Verfahren klären, ob die Färbung auf das primäre Antiserum oder die verwendete Methode zurückzuführen ist. Ein deutlicheres Bild über die Qualität der verwendeten Seren erhält man durch Auslassen jeweils eines der weiteren Inkubationsschritte. Beim Austausch des ersten Antikörpers gegen Puffer (TBS, 0,05 M, pH 7,4) und Normalserum einer anderen Spezies wurde keine Färbung beobachtet. Der gleiche Effekt konnte mit Normalserum der gleichen Spezies nur dann erreicht werden, wenn die Verdünnung der des Antiserums entsprach. Stärkere Konzentrationen führten zu geringer unspezifischer Färbung.

4.5.3. Präimmuntest

Wenn das Gewebe im Adsorptionstest gefärbt wird und im Negativtest keine Färbung aufweist, können kontaminierende primäre Antikörper die Ursache sein, die schon vor der Immunisierung im Serum vorhanden waren. Es ist deshalb sinnvoll, das Präimmunserum des gleichen Tieres in gleicher

Verdünnung wie das Antiserum auf diese mögliche falsch-positive Färbung zu testen (Swaab, 1977). Leider standen für die benutzten Antiseren keine Präimmunseren zur Verfügung.

4.6. Zur Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Unter den geschilderten Bedingungen findet die Immunreaktion nur an aufgeschnittenen, neuronalen Elementen statt und ist auf wenige oberflächliche um beschränkt (Piekut and Casey, 1983). Die Zellkörper- und Dendritenfärbung dringt tiefer ins Gewebe ein als die Terminalfärbung. Ein synaptisches Element wurde nur dann als negativ gewertet, wenn im gleichen Gesichtsfeld (Negativformat), bei einer primären Vergrößerung von 10000x, immunoreaktive Boutons vorhanden waren. Durch diese Maßnahme haben Unterschiede in der Qualität der Schnittführung (möglichst parallel zur Gewebsoberfläche) nur Einfluß auf die Menge der Befunde. Weil die Innervation der SN inhomogen über Zellgruppen erfolgen kann (Gerfen, 1985), mag das geschilderte Verfahren bei den Ibotensäureexperimenten zu einer Unterrepräsentierung von degenerierten Boutons im Verhältnis zu GABAergen Boutons führen. Diese eingeschränkte Auswertung ist möglicherweise der Grund für die Beobachtung, daß dunkle, degenerierte Boutons eher an GAD-positiven als an GAD-negativen Dendriten gefunden wurden.

4.7. Degeneration neuronaler Zellstrukturen

Ein wichtiger Aspekt bei der Degeneration neuronaler Elemente nach Läsionsexperimenten sind die postoperativen Überlebenszeiten. Im Falle der neurotoxischen Ibotensäureläsionen im Caudatum/Putamen wurde der Zeitverlauf der terminalen Degeneration getestet. Der optimale Zeitpunkt für den Nachweis degenerierter Boutons lag bei 5 Tagen nach der

Injektion. Wassef et al.(1981) geben 3 Tage nach striataler Kainsäureapplikation als besten Zeitpunkt zum Nachweis von degenerierten Boutons an dopaminergen Neuronen an.

Bei pränigraler Hemitranssektion waren die Dendriten- und Zellkörperdegenerationen (elektronendichtere cytoplasmatische Matrix, Brüche im endoplasmatischen Retikulum) auf transneuronale und/oder retrograde Degeneration der denervierten, nigralen Neurone zurückzuführen. Längere Überlebenszeiten hätten zu einer größeren Zahl degenerierter Boutons geführt, weil auch die lokalen Axonkollateralen dann in den degenerativen Prozeß einbezogen worden wären. Ihre Existenz konnte nur mit den hier gewählten kurzen Überlebenszeiten nachgewiesen werden.

4.8. GABAerge Neurone in der Substantia nigra

Die Analyse der Typologie von GABAergen Neuronen in der SNr von Kontrollratten nach Colchizininjektion vor die SN läßt den Schluß zu, daß diese Neurone in unterschiedlicher Form und Größe existieren. Die morphologische Variabilität in dieser elektronenmikroskopischen, immunocytochemischen Untersuchung wird unterstützt durch frühere Berichte mit Nissl- (Poirier et al., 1983) und Golgi-Methoden (Juraska et al., 1977) und fordert weitere Untersuchungen der neuronalen Typologie in der SN mit Kombinationen dieser Techniken. Von großem Wert wäre eine Zuordnung der verschiedenen Zellgrößen zu Unterschieden der axonalen Aufzweigung, efferenten Projektionen und Afferenzen neuronaler Partner (Beckstead et al., 1982; Domesick et al., 1983).

4.9. Läsionsexperimente

Die hier vorliegenden striatalen Läsionen mit dem Neurotoxin Ibotensäure bestätigten im Ergebnis die Untersuchun-

gen von Wassef et al.(1981) und Somogyi et al.(1981): Es existiert eine direkte striatale Projektion auf GAD-negative, wahrscheinlich dopaminerge nigro-striatale Neurone. Interessanterweise schienen jedoch degenerierte Boutons häufiger synaptische Kontakte mit GAD-positiven als mit GAD-negativen Neuronen einzugehen.

Ribak et al.(1980) fanden nach ipsilateralen Hemitranssektionen der striato-nigralen und pallido-nigralen Bahn in lichtmikroskopischen Untersuchungen eine beträchtliche Zahl verbliebener intakter GABAerger Terminale in der SNr. Sie vermuteten, daß diese restlichen Boutons von intrinsischen Neuronen der SN stammten. Zu gleichen Schlußfolgerungen veranlassen die Resultate der in dieser Arbeit durchgeführten prä-nigralen Hemiläsionen: Die zahlreichen restlichen intakten GABAergen Boutons müssen Perikarya haben, die in der SN oder caudal von ihr lokalisiert sind. Obwohl es bis heute keine Hinweise auf nigrale GABAerge Afferenzen aus dem Mittelhirn oder weiter caudal befindliche Ursprünge gibt (Groenewegen and van Dyke,1984), bleibt diese Möglichkeit auch nach prä-nigralen Läsionen bestehen.

SNr-Projektionsneurone, in Form und Größe entsprechend den großen GAD-immunoreaktiven Neuronen, sind bekannt für ihre extensiven lokalen Axonkollateralen (Grofova et al.,1982a), die eine inhibitorische Funktion in der SN haben sollen (Deniau et al.,1982). Golgi-Untersuchungen an Ratten und Primaten lassen auf die Existenz von Interneuronen schließen (Juraska et al.,1977; Francois et al.,1979), sie entsprechen möglicherweise den kleinen GAD-positiven Neuronen. So sind vermutlich wenigstens einige der überlebenden restlichen GABAergen Boutons nach prä-nigraler Läsion lokalen Ursprungs und modulieren die Aktivität der Projektionsneurone in der SN.

Es gibt eine Vielzahl von GABAergen Verbindungen der SN. Die Annahme, daß die monosynaptische GABAerge striato-nigrale Projektion eine GABA-Dopamin-Interaktion zur Folge hat, würde bedeuten, daß striatale Excitation die dopami-

nerge nigro-striatale Projektion hemmt. Physiologische und Verhaltensstudien haben jedoch gezeigt, daß dies nicht der hauptsächliche Effekt ist: Striatale Stimulation verstärkt dopaminerge Zellaktivität (Grace and Bunney, 1979; Braszko et al., 1981). Wahrscheinlich ist dies ein disinhibitorischer Effekt durch ein zweites inhibitorisches, GABAerges Neuron zwischen der GABAergen striatalen und der dopaminergen nigralen Nervenzelle. Das zwischengeschaltete Neuron kann sich in Höhe des Pallidums (Nauta, 1979) oder Nc. entopeduncularis (des inneren Gliedes des Primatenpallidums) befinden. Eine striato-pallido-nigrale Verbindung konnte morphologisch nachgewiesen (Totterdell et al., 1984) und der fördernde Einfluß von intrapallidalem GABA auf dopaminerge Transmission gezeigt werden (Scheel-Krüger et al., 1981). Das zwischengeschaltete Neuron könnte sich nach physiologischen und den hier beschriebenen Experimenten ebenso in der SNr befinden. Eine solche disynaptische, disinhibitorische, striato-nigrale Verbindung scheint bei der Kontrolle der dopaminergen Aktivität über die monosynaptische, inhibitorische zu dominieren (Grace and Bunney, 1985).

Die GABAergen nigralen Projektionsneurone erhalten ebenfalls eine monosynaptische striatale Afferenz (Williams and Faull, 1985). Das unterstützt Untersuchungsergebnisse, die auf die Existenz eines funktionell wichtigen, disinhibitorischen striatalen Einflusses auf thalamische Neurone hinweisen (Deniau and Chevalier, 1985). Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß die nigralen GABAergen Projektionsneurone ebenso unter der Kontrolle eines zusätzlichen, nichtstriatalen GABAergen Netzwerks stehen. Ein solches lokales Netzwerk kann aus rekurrenten Kollateralen von efferenten SN-Neuronen und Axonen lokaler Interneurone gebildet werden. Es ist möglich, daß GABAerge nigrale Projektionsneurone nach Hemmung durch eine direkte striatale Afferenz eine Disinhibition durch ihre rekurrenten Kollateralen schaffen und damit andere Gruppen von Projektionsneuronen beeinflussen (Deniau et al., 1982). Disinhibition in der SN würde zu

einer Zunahme der Inhibition ihrer Zielneurone in Thalamus und Tectum führen. Solch eine Verbindungsschleife könnte einen verbesserten Informationskontrast im Zielgebiet zur Folge haben, vorausgesetzt, eine Geometrie der Axonverteilung existiert.

Bisher war die Rede vom mengenmäßig wichtigsten striato-nigralen Transmitter GABA. Unter den anderen schon erwähnten nachgewiesenen nigralen Transmittersubstanzen gilt besonderes Augenmerk den Peptiden Substanz P (Gale et al., 1977; Somogyi et al., 1982) und dem Opioidpeptid Dynorphin A (Vincent et al., 1982a+b) in striatonigralen Projektionen.

4.10. Die dynorphinerge striato-nigrale Projektion

Die SNr von Ratten, Rhesusaffen und Katzen enthält sehr viele dynorphinerge Terminale (Khachaturian et al., 1982; 1985; Chesselet and Graybiel, 1983), aber keine Dynorphinhaltigen Zellkörper (Dores and Akil, 1985). Dynorphinerge Fasern finden sich vor allem im basalen Teil der SNr und sind auf Zellkörper in Corpus und caudalem Teil (Christensson-Nylander et al., 1986) bzw. Kopf des Striatums (Palkovits, 1984) zurückzuführen. Die große Dichte von dynorphinergen Fasern in der SN (Vincent et al., 1982b) läßt eine Interaktion mit den zahlreichen dopaminergen und/oder GABAergen Neuronen erwarten. Im Grenzbereich der SNr zur SNc finden sich dynorphinerge Terminale an Dendriten und Soma. Im antero-basalen Teil der SNr wurden nur axo-dendritische Kontakte gefunden. Dynorphinhaltige Fasern umgeben die Dendriten von nigro-striatalen dopaminergen Neuronen (Herrera-Marschitz et al., 1986). Die ausschließlichen Kontakte dynorphinergender Terminalen mit vermutlich dopaminergen Dendriten im antero-basalen Teil der SNr sind möglicherweise auf den Mangel an somatischen, postsynaptischen Zielen zurückzuführen. Dopaminerge Neurone gibt es bis auf wenige

Ausnahmen nur in der SNc. Ihre Dendriten reichen jedoch bis in die SNr (Juraska, 1977).

Es gibt bisher keine ultrastrukturelle Charakterisierung dynorphinerger Boutons wie z.B. für Substanz P-haltige (Somogyi et al., 1982) und GAD-haltige Boutons (Ribak et al., 1976) in der SN. Jede individuelle Substanz P-haltige Faser bildet nur Boutons eines Typs aus. So hatte eine identifizierte Faser acht sogenannte Varikositäten, die synaptische Kontakte mit den Dendriten oder dem Soma eines Neurons hatten. Es wurden zwei Typen von Substanz P-haltigen Boutons beschrieben. Typ 1 enthielt große, manchmal granuliert Vesikel und bildete symmetrische Synapsen mit Dendriten. Typ 2 Boutons enthielten kleine runde, manchmal große granuliert Vesikel und bildeten asymmetrische Synapsen mit Dendriten und Zellkörpern (Somogyi et al., 1982). Sie gleichen damit weitgehend den dynorphinergen Boutons des Typs B, während Typ 1 Boutons Ähnlichkeit mit GAD-Boutons bzw. den dynorphinergen Typ A Boutons haben.

Im Striatum machen Enkephalin-haltige ebenso wie dopaminerge Terminale (Freund et al., 1984) mehr symmetrische als asymmetrische Kontakte mit Dendriten oder neuronalen Zellkörpern (Pickel et al., 1980; DiFiglia et al., 1982). Im antero-basalen Teil der SNr, der in dieser Arbeit besonders untersucht wurde, gibt es zumindest einen großen Anteil an dynorphinergen Terminalen, vermutlich striatalen Ursprungs (Christensson-Nylander et al., 1986), mit asymmetrischen Kontakten neben eindeutig symmetrischen Synapsen. Auf der Basis dieser morphologischen Kriterien kann man also nicht von einer excitatorischen oder inhibitorischen dynorphinergen Funktion sprechen. Ein weiteres Faktum kommt hinzu, das ein Verständnis für die Rolle des dynorphinergen striato-nigralen Systems erschwert: In striato-pallidalen und striato-nigralen Projektionsneuronen von Vögeln und Reptilien sind Substanz P und Dynorphin A 1-17 kolokalisiert (Reiner, 1986). Durch die fundamental ähnliche Basalganglienorganisation unter Amnioten ist eine solche Koexistenz

auch bei Säugern zu erwarten. Allerdings sahen Herrera-Marschitz et al. (1986) unterschiedliche Funktionen von Substanz P und Dynorphin A in striato-nigralen Projektionen. Intranigrale Injektion von Dynorphin A reduziert, Substanz P erhöht die Ausschüttung von Dopamin im Striatum. Bei möglichen Interaktionen zwischen dynorphinergen und dopaminergen Neuronen (Quirion et al., 1985; Herrera-Marschitz et al., 1986; Li et al., 1986) erschweren diese Voraussetzungen die Aufklärung des ohnehin schon komplizierten Sachverhalts.

Es gibt zahlreiche Hinweise zur Existenz von Interaktionen zwischen dopaminergen und enkephalineren Systemen in Basalganglien (Graybiel and Ragsdale, 1983) und es ist bekannt, daß Enkephaline dopaminerge Zellaktivitäten vermutlich über Opioidrezeptoren an dopaminergen Terminalen (Pollard et al., 1977) modulieren (Broekkamp et al., 1979; Finnerty and Chan, 1979; Joyce and Iversen, 1979). In Striatum und SN gibt es, wenn auch in geringer Anzahl, präsynaptische Dopamin- und Opiatrezeptoren neben einer Mehrheit von postsynaptischen Dopaminrezeptoren an dendritischen Spines, bzw. Opiatrezeptoren an Dendriten und Somata (van der Kooy et al., 1986). Dynorphin hat nach elektrophysiologischen Untersuchungen einen lang anhaltenden inhibitorischen Effekt auf 70% der SNr-Neurone. Diese Inhibition kann durch Gabe von Naloxon, einem Morphin-Antagonisten, aufgehoben werden (Lavin and Garcia-Munoz, 1985). Nach Walker and Friederich (1985) bewirken Dynorphine eine Disinhibition dopaminergere Zellen durch die Hemmung von Interneuronen in der SNr.

Nach chronischer Haloperidol-Behandlung (Haloperidol = Dopamin-Antagonist) nimmt die Menge an dynorphinergen Peptiden in Striatum, Pallidum und SN zu (Quirion et al., 1985). Der Leu-Enkephalingehalt verändert sich in diesen Experimenten wie die Menge an dynorphinergen Peptiden, während der Met-Enkephalingehalt in der SN unverändert bleibt. Leu-Enkephalin ist deshalb in der striato-nigralen

Bahn von Prodynorphin abzuleiten (Zamir et al., 1984; Quirion et al., 1985). Die Leu-Enkephalin/Dynorphin-Projektion scheint unter striatalem, dopaminergem Einfluß zu stehen, weil eine chronische Neuroleptika-Behandlung den Gehalt an Opioidpeptiden in Zellkörpern und terminalen Feldern ansteigen läßt (Quirion et al., 1985). Weil Injektionen von Dynorphin-Peptiden in die SN von Ratten ein Dosis-abhängiges, kontralaterales Rotationsverhalten auslöst, das durch Amphetamin verstärkt wird, kann auch ein Einfluß von Dynorphin A auf motorische Funktionen angenommen werden (Herre-Marschitz et al., 1986).

Weitere physiologische und Verhaltensexperimente werden nötig sein, um vor allem die striato-nigrale Kooperation von Substanz P, Dynorphin und GABA zu verstehen.

4.11. Interaktionen von Dynorphin A und GABA im striato-nigralen System

Verschiedene Transmittersubstanzen und/oder Neuropeptide können entweder in Koexistenz von gleichen Boutons oder jeweils allein von verschiedenen Boutons auf postsynaptische Neurone einwirken. Beide Mechanismen sind vergleichbar, denn auch koexistierende, unterschiedliche Überträgerstoffe können unabhängig voneinander ausgeschüttet werden (Hökfelt et al., 1987), so daß ein gleichzeitiger oder zeitlich getrennter Einfluß auf den postsynaptischen Partner möglich ist. Die wichtigste Frage ist dabei: In welchem Ausmaß werden die verschiedenen Moleküle von Nervenendigungen ausgeschüttet und wie sind sie am Signalübertragungsprozeß beteiligt ?

Neurone enthalten im Falle einer solchen Koexistenz entweder mehr als eine Transmittersubstanz (z.B. klassischer Transmitter und Peptid) oder die Peptide in diesen Neuronen haben eine andere als die typische Transmitterfunktion. Auch bei separatem Vorkommen ist die molekülspezifische

Wirkung als unverändert anzunehmen, aber die biochemische Umgebung, die synaptische Organisation, das Zusammenspiel mit anderen Transmittersubstanzen und das Rezeptorverhalten haben wichtige Einflüsse auf die Wirksamkeit einer Substanz.

So konnte für Cholecystokinin (CCK) in dopaminergen Neuronen der Area tegmentalis ventralis (A 10) des Mittelhirns ein ortsabhängiger Koexistenzgradient gezeigt werden (Hökfelt et al., 1987). Die Koexistenz von CCK und Dopamin nimmt in caudaler Richtung zu, beträgt in der pars lateralis nahezu 100% und ist in der pars reticulata fast gar nicht nachzuweisen.

Die gegensätzliche Wirkung von Substanz P und Dynorphin auf nigro-striatale Dopaminneurone spricht gegen eine Koexistenz von Substanz P und Dynorphin in striato-nigralen Projektionen (Herrera-Marschitz et al., 1986), obwohl Substanz P-immunoreaktive Terminale der SNr (Somogyi et al., 1982) z.T. große morphologische Ähnlichkeit mit einem Teil der dynorphinergen Terminalen haben (asymmetrische Kontakte; kleine, überwiegend runde Vesikel) und Substanz P und Dynorphin im Striatum (von Sauropsiden) koexistieren (Reiner, 1986).

Der Nachweis einer Koexistenz von Opioidpeptiden und GABA in Striatumneuronen (Oertel et al., 1983; Aronin et al., 1984) muß nicht automatisch eine ebensolche Koexistenz in neuronalen Elementen der SN zur Folge haben. Die überwiegende Mehrzahl der Beobachtungen von Koexistenzen wurde im Lichtmikroskop gemacht und da sind naturgemäß nur die Zellkörper zu beurteilen. Sollten tatsächlich GABA und Dynorphin A in striato-nigralen Projektionsneuronen koexistieren, so ist eine Kanalisierung der einzelnen Transmitter im Bereich der axonalen Verzweigung auf einzelne Boutons zu postulieren.

Allerdings scheint eine physiologische, direkte Beziehung zwischen GABA und Dynorphin möglich zu sein: Bilaterale, intranigrale Injektionen von 10 µg Dynorphin A hatten neben

Morphin in gleicher Dosierung die stärkste antinociceptive Wirkung bei Ratten. Auch Muscimol, ein GABA-Agonist, hatte nach gleicher Applikation eine schmerzhemmende Wirkung (Baumeister et al., 1987). Nach vorläufigen Ergebnissen von Herrera-Marschitz et al. (1986) führen sowohl intranigrale GABA- als auch Dynorphin-Injektionen zu einer Abnahme der Menge an Dopamin im Striatum. Dynorphin hat ebenso wie GABA eine inhibitorische Wirkung auf einen großen Teil der SNr-Neurone (Lavin and Garcia-Munoz, 1985). Robertson et al. (1987) fanden bei elektrophysiologischen Untersuchungen an Neuronen der SN nach Dynorphinapplikation sowohl Zellen die inhibitorisch reagierten, als auch solche, die mit einer langsamen Excitation antworteten. Bei Neuronen des ersten Typs hatte die gleichzeitige Gabe von Dynorphin und GABA einen additiven inhibitorischen Effekt, bei Zellen des 2. Typs kam es zur Abschwächung einer GABA-induzierten Inhibition nach Dynorphinapplikation. Diese physiologische Beziehung wird durch den morphologischen Nachweis GABAerger Boutons an dopaminergen Zellen (van den Pol et al., 1985) und die erwähnten Dynorphin-haltigen Fasern an Dendriten dopaminergener Neurone (Herrera-Marschitz et al., 1986) sowie GABAerger und unterschiedlicher dynorphinergener Afferenzen an nicht identifizierten, vermutlich dopaminergen Dendriten (vorliegende Arbeit), unterstützt.

Dynorphin-, Dopamin-, Substanz P- und GABA-haltige Elemente sind im Striatum auf fleckförmige Striosomen ("patches") oder dazwischenliegende Matrix verteilt (Graybiel, 1983; 1984; 1987; McGinty, 1987). Gruppen von Dopamin-haltigen Zellen in der SNc projizieren spezifisch zu Striosomen oder Matrix im Striatum (Graybiel, 1987). Auch Dopaminrezeptoren sind nach einem ähnlichen Muster verteilt. Dabei ist eine Übereinstimmung von Arealen geringer Rezeptordichte mit Striosomen geringen Acetylcholinesterasegehalts festzustellen (Loopuijt et al., 1987). Es sind also unterschiedliche Funktionen bei verschiedenen Zellgruppen trotz gleichen Transmitters in der SN anzunehmen; z.B. wer-

den nur die Informationen zur striatalen Matrix von dort zum Thalamus und Cortex weitergeleitet (Graybiel, 1987). Gerfen (1985) fand zwei verschiedene Typen von striosomal organisierten striato-nigralen Projektionen. Während der 1. Typ medio-lateral und dorso-ventral in Striatum und SN ungefähr gleichartig verteilte Loci aufweist und sich die afferenten Felder in der SN aus separaten striatalen Gebieten teilweise überlappen, ist der 2. Typ nicht topografisch organisiert. Nach verschiedenen Tracer- und immunocytochemischen Studien vermutet Gerfen (1985) nach Patch- und Matrixfeldern getrennte striato-nigrale Projektionen, die lokal durch intrinsische striatale Neurone verbunden sind. Die funktionellen Konsequenzen dieser Organisation sind groß: Individuelle Subsysteme in den Basalganglien sorgen unter normalen physiologischen Bedingungen für individuelle Funktionen und sind möglicherweise ein Ursprung spezieller Pathologien. Besonders im Zusammenhang mit den erwähnten unterschiedlich organisierten Gruppen von dopaminergen Neuronen in der SNc (Graybiel, 1987) wird die Gruppenbildung von GABAergen und dynorphinergen Boutons, wie sie in den vorliegenden Untersuchungen beobachtet wurde, sinnvoll.

Die weitgehende räumliche Trennung von Gruppen dynorphinerner und GABAerger Boutons in der SNr läßt auf unterschiedliche Funktionen schließen. Im Falle der Nachbarschaft dynorphinerner und GABAerger Boutons ist dagegen eine wörtlich zu nehmende "gegenseitige" Beeinflussung des gleichen (dopaminergen ?) Zieles zu erwarten. Nach Identifizierung der postsynaptischen Partner wird eine weitere Unterteilung der heterogenen, dynorphinergen Boutonpopulation möglich sein.

Wenn jedes dynorphinerge striato-nigrale Axon nur einen der beschriebenen Boutontypen ausbildet, wie es für Substanz P-haltige Boutons beschrieben wurde (Somogyi et al., 1982), könnte das eine sehr individuelle, nur Kleinpopulationen von Boutons und Dendriten betreffende, noch feinere Verschaltung zur Folge haben, wie sie in ähnlicher

Weise für striosomale Neuronenorganisationen gilt (Gray-biel, 1987).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Vibratonschnitte der Substantia nigra von unbehandelten und stereotaktisch operierten Ratten wurden immunocytochemisch zum Nachweis der unterschiedlichen Verteilung von GABA und Dynorphin A 1-17 untersucht. Die Interaktion von GABA- und Dynorphin A-haltigen neuronalen Elementen konnte mit Hilfe einer neu entwickelten immunocytochemischen Doppelmarkierung auf ultrastruktureller Ebene dargestellt werden.

1. Sowohl GAD-immunoreaktive Neurone als auch nicht-immunoreaktive Neurone in der Substantia nigra pars reticulata erhielten eine dichte Innervation GAD-positiver Terminale des gleichen Boutontyps.
2. Um den Ursprung dieser GABAergen Afferenzen zu bestimmen, wurden die Projektionen zwischen Striatum und Substantia nigra durch begrenzte Ibotensäureinjektionen im Striatum zerstört, bzw. durch komplette Hemitranssektionen am frontalen Pol der Substantia nigra durchtrennt. Nach Überlebenszeiten von 40 Std. bis 7 Tagen wurden die Kontakte zwischen GAD-positiven und -negativen Neuronen und degenerierten und erhaltenen Boutons untersucht. Nach beiden Läsionsarten sind zahlreiche GAD-immunoreaktive Boutons weiterhin erhalten und bilden Kontakte mit GAD-positiven als auch -negativen Neuronen. In der Substantia nigra stehen also die striato-nigro-striatalen ebenso wie die striato-nigro-thalamischen Projektionen unter der Kontrolle inhibitorischer Axonkollaterale der GABAergen pars reticulata Neurone.
3. Mit dem Antikörper gegen GABA ließen sich die gleichen neuronalen Strukturen markieren wie mit dem GAD-Antikörper. Die Immunfärbung der GABA-positiven Dendriten war in der Regel intensiver als beim GAD-Nachweis. Die Boutonfärbung war auf einen schmalen Randbereich des Gewebeschnitts beschränkt. Im Unterschied zu GAD-Färbungen

konnten mit dem GABA-Antikörper häufiger myelinisierte Axone markiert werden.

4. Dynorphin A 1-17 konnte nur in Terminalen, nicht in Zellkörpern der Substantia nigra pars reticulata nachgewiesen werden. Aus einer Vielzahl morphologisch unterschiedlicher Boutons ließen sich zwei deutlich unterscheidbare Typen klassifizieren. Eine Teilpopulation von Dynorphin A-haltigen Boutons wies die gleiche Ultrastruktur wie GAD-immunoreaktive Terminale auf (große, pleomorphe Vesikel, symmetrische Kontakte mit Dendriten) und wurde als Typ A bezeichnet. Terminale mit kleineren, überwiegend runden, teilweise pleomorphen Vesikeln hatten asymmetrische dendritische Kontakte (Typ B). Weitere Dynorphin-haltige Boutons hatten ein vielfältiges Erscheinungsbild mit Unterschieden in der Größe und Form von Vesikeln und bildeten symmetrische oder asymmetrische Kontakte mit Dendriten.
5. Bei der Doppelmarkierung mit PAP/DAB und Streptavidin/Gold wurde keine Koexistenz von GAD und Dynorphin A 1-17 in Boutons festgestellt. Anhäufungen von GAD-immunoreaktiven Boutons überlappten sich nur geringfügig mit Gruppen von Dynorphin A-haltigen Terminalen des Typs A und B. Selten bildeten GAD- und Dynorphin-positive Boutons Kontakte mit dem gleichen Dendriten.
6. GAD und GABA konnten im Gegensatz zu GAD und Dynorphin koexistent in Boutons nachgewiesen werden, so daß man von einer verläßlich arbeitenden Doppelmarkierung ausgehen kann, die auch bei anderen Transmittersystemen und Hirnregionen interessante Ergebnisse verspricht.
7. Die Befunde deuten auf morphologisch und überwiegend räumlich getrennte Einflüsse von GABA und Dynorphin auf vermutlich dopaminerge Neurone in der Substantia nigra pars reticulata.

6. ANHANG

6.1. Postembedding-Verfahren für immuncytochemische Markierung von Transmitterkandidaten

Die zunächst versuchten preembedding-Methoden mit Immungold-Reagenzien von BioRad und Janssen, anstelle von Streptavidin-Gold-Lösung, führten trotz umfangreicher Verdünnungsreihen der Immungold-Reagenzien (1:1 - 1:50) und Inkubationszeiten von 30 min bis 6 Std. nicht zu den gewünschten spezifischen Ergebnissen. Deshalb schienen die postembedding-Methoden mit gold-gekoppelten IgG-Antisera bzw. Protein A-Gold-Reagenzien eine gute Alternative bzw. Ergänzung zu sein, zumal bei diesen Methoden die Goldpartikelgröße nicht so entscheidend für den Erfolg einer Markierung ist.

In Anlehnung an Bendayan and Zollinger (1983) und van den Pol et al. (1985) wurden zahlreiche Experimente gemacht. Dabei war zunächst daran zu denken, daß nach Einbettung in Epon und anderen Epoxiden die Antigene durch eine hydrophobe Barriere isoliert werden können, so daß eine Immunreaktion erschwert wird. Ultradünnschnitte werden deshalb in der Regel vor der Inkubierung mit Antiserum einer "etching"-Prozedur unterzogen, bei der sie einige Minuten 1-10% Wasserstoffperoxid oder Na-meta-periodat ausgesetzt sind (Bendayan and Zollinger, 1983). Die deutliche Zunahme der Immunoreaktivität nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid ist weniger auf eine Auflösung oder Ätzung des Epons, als vielmehr auf ein hydrophiles Schwellen der Gewebselemente im Schnitt zurückzuführen (Erlandsen et al., 1979). Baskin et al. (1979) diskutieren die Möglichkeit, daß freie Aminogruppen der Antigene Querverbindungen mit Plastikmonomeren eingehen und die so entstandenen sterischen und hydrophoben Hindernisse den Zugang von Antikörpern zu Antigenen verhindern.

Die Nickelgrids wurden mit den Ultradünnschnitten nach

unten 15 min auf Tropfen von 10% BSA (bovine serum albumin) in TBS gelegt. Anschließend schwammen die Präparate 30 min bis 6 Std. bei Zimmertemperatur auf Tropfen des verdünnten spezifischen Antikörpers (Verdünnungen 1:500-1:2000) gegen GAD bzw. Dynorphin A. Nach gründlicher Spülung in 1% BSA lagen die Schnitte 15-60 min auf 1:10-1:50 verdünntem Immunogold-Serum bzw. Protein A-Gold-Lösung (Protein A hat eine starke Affinität zu IgG). Nach gründlicher Spülung mit TBS folgte eine zehnminütige Nachfixierung mit 1% Glutaraldehyd in TBS und angemessene Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. Auf Osmiumtetroxidfixierung war verzichtet worden, um die Immunoreaktivität zu erhöhen.

Nachdem sich in zahlreichen Testreihen keinerlei Hinweis auf eine spezifische Immunreaktion fand, wurden noch folgende Verbesserungen versucht:

- Präinkubation mit α -methyl-D-mannoside oder Mouse-liver-powder zusätzlich zur üblichen Lysine/Normalserum-Blokierung.
 - Variierung der Inkubationsdauer des 1. Antikörpers von 1 Stunde bei Zimmertemperatur bis zu 12 Std. bei 4°C.
 - Veränderung des pH-Wertes der Primärserumverdünnung zwischen 7,4 und 8,6 (Einfluß des isoelektrischen Punktes).
- Es wurde kein Einfluß dieser Rezepturen auf die Goldverteilung festgestellt.

Neben dem Einbettungsmedium haben auch die Einbettungstemperatur bis 60°C und die Entwässerung ungünstige Einflüsse vor allem auf Enzyme wie GAD (Pelletier and Morel, 1984; Armbruster et al., 1983). Deshalb wurde versucht mit dem Acrylharz LR White (London Resin Company) die Immunoreaktivität für postembedding-Verfahren zu erhöhen. LR White hat folgende Vorteile gegenüber Epoxiden:

- geringe Toxizität
- es ist dünnflüssiger als andere Einbettungsmedien und zudem hydrophil, was die Infiltration wässriger Lösungen

in den Ultradünnschnitt erleichtert und eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid ("etching") überflüssig macht.

- es erlaubt die Einbettung unvollständig entwässerten Gewebes
- durch die Löslichkeit in Alkohol reicht eine Dehydrierung mit höchstens 70% Ethanol zur vollständigen Infiltration aus
- Wasser und Alkohol müssen nicht durch Aceton und Propylenoxid ersetzt werden
- es polymerisiert bei nur 50°C in 24 Stunden und erhöht durch diese Eigenschaften die Immunreaktivität (Newman and Jasani, 1984; London Resin Co., 1985).

Zwei große Nachteile machen den Umgang mit LR White problematisch:

1. Bei Wärmepolymerisierung ist Sauerstoff-Kontakt zu vermeiden, sonst bleibt die Härtung aus.
2. Der Gewebeerhalt ist ohne Osmiumtetroxidfixierung unvergleichlich schlechter als bei Epon-Einbettung.

Trotz großen Aufwandes und zahlreicher Experimente führten in unserer Hand die postembedding-Verfahren bisher nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

6.2. Häufig verwendete Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin/Peroxidase-Komplex
BSA	Bovine Serum Albumin
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAG	Donkey anti Goat Serum
GABA	Gamma-aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GAR	Goat anti Rabbit Serum
IgG	Immunglobulin G
NGS	Normal Goat Serum
NRS	Normal Rabbit Serum
PAP	Peroxidase anti Peroxidase-Komplex
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatpuffer in physiologischer Kochsalzlösung
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNl	Substantia nigra pars lateralis
SNr	Substantia nigra pars reticulata
SP	Substanz P
TBS	Tris buffered saline, Trispuffer in physiologischer Kochsalzlösung

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Anden NE, Carlsson A, Dahlström A, Fuxe K, Hillarp NA, Larsson K (1964): Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci.* 3: 523-530.
- Anderson M, Yoshida M (1977): Electrophysiological evidence for branching nigral projections to the thalamus and the superior colliculus. *Brain Res.* 137: 361-364.
- Anthony ELP, King JC (1986): Combined light and electron microscope immunocytochemical localization of scattered peptidergic neurons in the central nervous system. *Am J. Anat.* 175: 179-195.
- Arluison M, Conrath-Verrier M, Tauc M, Mailly P, Seraphin de la Manche I, Dietl M, Cesselin F, Bourgoin S, Hamon M (1983): Met-enkephalin-like immunoreactivity in rat forebrain and spinal cord using hydrogen peroxide and Triton X-100. Ultrastructural study. *Brain Res. Bull.* 11: 573-586.
- Armbruster BL, Garavito RM, Kellenberger E (1983): Dehydration and embedding temperatures affect the antigenic specificity of tubulin and immunolabeling by the protein A-colloidal gold technique. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 1380-1384.
- Aronin N, DiFiglia M, Graveland GA, Schwartz WJ, Wu J-Y (1984): Localization of immunoreactive enkephalins in GABA synthesizing neurons of the rat neostriatum. *Brain Res.* 300: 376-380.
- Bak IJ (1967): The ultrastructure of the substantia nigra and caudate nucleus of the mouse and the cellular localization of catecholamines. *Exp. Brain Res.* 3: 40-57.
- Baskin DG, Erlandsen SL, Parsens JA (1979): Influence of hydrogen peroxide or alcoholic sodium hydroxide on the immunocytochemical detection of growth hormone and prolactin after osmium fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1290-1292.
- Baumeister AA, Hawkins MF, Anticich TG, Moore LL, Higgins TD (1987): Bilateral intranigral microinjection of morphine and opioid peptides produces antinociception in rats. *Brain Res.* 411: 183-186.
- Beckstead RM, Frankfurter A (1982): The distribution and some morphological features of substantia nigra neurons that project to the thalamus, superior colliculus and pedunculopontine nucleus in the monkey. *Neurosci.* 7: 2377-2388.

- Bendayan M, Zollinger M (1983): Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J.Histochem.Cytochem.* 31: 101-109.
- Bentivoglio M, van der Kooy D, Kuypers H (1979): The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the cat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.* 174: 1-17.
- Bigbee JW, Kosek JC, Eng LF (1977): Effects of primary antiserum dilution on staining of "antigen-rich" tissues with the peroxidase antiperoxidase technique. *J.Histochem.Cytochem.* 25: 443-447.
- Bolam JP, Somogyi P, Totterdell S, Smith AD (1981): A second type of striatonigral neuron: A comparison between retrogradely labelled and Golgi-stained neurons at the light and electron microscopic levels. *Neurosci.* 6: 2141-2157.
- Bonnard C, Papermaster DS, Kraehenbuhl J-P (1984): The streptavidin-biotin bridge technique: Application in light and electron microscope immunocytochemistry. In: *Immunolabelling for electron microscopy* (J.M.Polak, I.M.Varndell, eds.), Elsevier Science Publishers B.V.: 95-112.
- Brandon C (1985): Improved immunocytochemical staining through the use of Fab fragments of primary antibody, Fab-specific second antibody, and Fab-horseradish peroxidase. *J.Histochem.Cytochem.* 33: 715-719.
- Braszkó JJ, Bannon MJ, Bunney BS, Roth RH (1981): Intrastriatal kainic acid: acute effects on electrophysiological and biochemical measures of nigrostriatal dopamine activity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 216: 289-293.
- Broekkamp CLE, Phillips AG, Cools AR (1979): Stimulant effects of enkephalin microinjection into the dopaminergic A10 area. *Nature* 278: 560-562.
- Brownstein MJ, Mroz EA, Kizer JS, Palkovits M, Leeman SE (1976): Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res.* 116: 299-305.
- Chavkin C, Goldstein A (1981): Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure-activity relationships. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78: 6543-6547.
- Chesselet MF, Graybiel AM (1983): Met-enkephalin-like and dynorphin-like immunoreactivities of the basal ganglia of the cat. *Life Sci.* 33: 37-40.

- Chevalier G, Thierry AM, Shibazaki T, Feger J (1981): Evidence for a GABAergic inhibitory nigroretectal pathway in the rat. *Neurosci.Lett.* 21: 67-70.
- Childs GV (1982): Use of immunocytochemical techniques in cellular endocrinology. In: *Electron microscopy in biology*, Vol.2, (Griffith J, ed.), Wiley, New York: 107-179.
- Childs JA, Gale K (1981): Neurochemical characterization of the nigroreticular projections in the rat. *Neurosci. Abst.* 7, 196.
- Christensson-Nylander I, Herrera-Marschitz M, Staines W, Hökfelt T, Terenius L, Ungerstedt U, Cuello AC, Oertel WH, Goldstein M (1986): Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat. I. Biochemical and immunohistochemical studies. *Exp.Brain Res.* 64: 169-192.
- Clavier RM, Atmadja S, Fibiger HC (1976): Nigrothalamic projections in the rat as demonstrated by orthograde and retrograde tracing techniques. *Brain Res.Bull.* 1: 379-384.
- Corbett AD, Paterson SJ, McKnight AT, Magnan J, Kosterlitz H (1982): Dynorphin (1-8) and dynorphin (1-9) are ligands for the kappa subtype of opiate receptor. *Nature* 299: 79-81.
- Cuello AC, Kanazawa I (1978): The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J.comp.Neurol.* 178: 129-156.
- Dahlström A (1968): Effect of colchicine on transport of amine storage granules in sympathetic nerves of rat. *Europ.J.Pharmacol.* 5: 111-113.
- Danner H, Pfister C (1982): Sieben Neurontypen in der Substantia nigra der Ratte. Eine Golgi-rapid Imprägnationsstudie. *J.f.Hirnforsch.* 23: 553-566.
- Danscher G (1981): Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* 71: 1-16.
- Dasheiff RM, Ramirez LF (1985): The effects of colchicine in mammalian brain from rodents to rhesus monkeys. *Brain Res.Rev.* 10: 47-67.
- DeMontis GM, Olanas M, Mulas G, Lloyd K, Tagliamonte A (1981): GABA receptors distribution in rat substantia nigra. *Neurosci.Lett.* 23: 257-261.
- Deniau JM, Chevalier G (1985): Disinhibition as a basic

- process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigral influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus. *Brain Res.* 334: 227-233.
- Deniau JM, Lockner D, Feger J (1978): Effects of substantia nigra stimulation on identified neurons in the VL-VA thalamic complex: Comparison between intact and chronically decorticated cats. *Brain Res.* 145: 27-35.
- Deniau JM, Kitai ST, Donoghue JP, Grofova I (1982): Neuro-nal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axonal collaterals of projection neurons. *Exp. Brain Res.* 47: 105-113.
- DiChiara G, Porceddu ML, Morelli M, Mulas ML, Gessa GL (1979): Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus in the rat. *Brain Res.* 176: 273-284.
- DiFiglia M, Aronin N, Martin JB (1982): Light and electron microscopic localization of immunoreactive leu-enkephalin in the monkey basal ganglia. *J. Neurosci.* 2: 303-320.
- Domesick VB, Stinus L, Paskevich PA (1983): The cytology of dopaminergic and nondopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat: A light- and electronmicroscopic study. *Neurosci.* 8: 743-765.
- Dores RM, Akil H (1985): Steady state levels of pro-dynorphin-related end products in the striatum and substantia nigra of the adult rhesus monkey. *Peptides* 6: 143-148.
- Dores RM, Lewis ME, Khachaturian H, Watson SJ, Akil H (1985): Analysis of opioid and non-opioid end products of pro-dynorphin in the substantia nigra of the rat. *Neuropeptides* 5: 501-504.
- Dube D, Pelletier G (1979): Effect of colchicine on the immunohistochemical localization of somatostatin in the rat brain: Light and electron microscopic studies. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1577-1581.
- Eckert M, Ude J (1983): Immunocytochemical techniques for the identification of peptidergic neurons. In: *Functional neuroanatomy* (Strausfeld NJ, ed.), Springer Verlag: 267-301.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960): Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wschr.* 38: 1236-1239.
- Erlandsen SL, Parsons JA, Rodning CB (1979): Technical parameters of immunostaining of osmicated tissue in epo-

- xy sections. *J.Histochem.Cytochem.* 27: 1286-1289.
- Eugster CH (1968): Wirkstoffe aus dem Fliegenpilz. *Naturwissenschaften* 55: 305-313.
- Fahn S, Cote LJ (1968): Regional distribution of GABA in brain of the rhesus monkey. *J.Neurochem.* 15: 209-213.
- Fallon JH, Leslie FM, Cone RI (1985): Dynorphin-containing pathways in the substantia nigra and ventral tegmentum: A double labeling study using combined immunofluorescence and retrograde tracing. *Neuropeptides* 5: 457-460.
- Fass B, Butcher LL (1981): Evidence for a crossed nigro-striatal pathway in rats. *Neurosci.Lett.* 22: 109-113.
- Faulk W, Taylor G (1971): An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunohistochem.* 8: 1081-1083.
- Faull RLM, Mehler WR (1978): The cells of origin of nigro-tectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neurosci.* 3: 989-1002.
- Feltz, P (1971): γ -Aminobutyric acid and a caudato-nigral inhibition. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 49: 1113-1115.
- Finnerty EP, Chan SH (1979): Morphine suppression of substantia nigra zona reticulate neurons in the rat: implicated role for a novel striatonigral feedback mechanism. *Eur.J.Pharmacol.* 59: 307-310.
- Flament-Durand J, Dustin P (1972): Studies on the transport of secretory granules in the magnocellular hypothalamic neurons. I.Action of colchicine on axonal flow and neurotubules in the paraventricular nuclei. *Z.Zellforsch.* 130: 440-454.
- Flucher BE (1984): Detecting the cause of non-specific staining in immuno-cytochemistry (PAP-Methode). *Mikroskopie* 41: 219-226.
- Fonnum F, Gottesfeld I, Grofova I (1978): Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striatopallidal, striatoentopeduncular and striatonigral GABAergic fibers. *Brain Res.* 143: 125-138.
- Francois C, Percheron G, Yelnik J, Heyner S (1979): Demonstration of the existence of small local circuit neurons in the golgi-stained primate substantia nigra. *Brain Res.* 172: 160-164.
- Freund TF, Powell JF, Smith AD (1984): Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with iden-

- tified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci.* 13: 1189-1215.
- Frigyessi TL, Purpura DP (1967): Electrophysiological analysis of reciprocal caudatonigral relations. *Brain Res.* 6: 440-456.
- Gale K, Hong JS, Guidotti A (1977): Presence of substance P and GABA in separate striatonigral neurons. *Brain Res.* 136: 371-375.
- Gerfen CR (1985): The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J.comp.Neurol.* 236: 454-476.
- Gerfen CR, Staines WA, Arbuthnott GW, Fibiger HC (1982): Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J.comp.Neurol.* 207: 283-303.
- Gosselin EJ, Cate CC, Pettengill OS, Sorenson GD (1986): Immunocytochemistry: Its evolution and criteria for its application in the study of epon-embedded cells and tissue. *Am.J.Anat.* 175: 135-160.
- Grace A, Bunney BS (1979): Paradoxical GABA excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons. *Eur.J.Pharmacol.* 59: 211-218.
- Grace A, Bunney BS (1985): Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res.* 333: 271-284.
- Graybiel AM (1983): Compartmental organization of the mammalian striatum. *Prog.Brain Res.* 58: 247-256.
- Graybiel AM (1984): Correspondence between the dopamine islands and striosomes of the mammalian striatum. *Neurosci.* 13: 1157-1187.
- Graybiel AM (1986): Neuropeptides in the basal ganglia. In: *Neuropeptides in Neurologic and Psychiatric Disease* (JB Martin, JD Barchas, eds.), Raven Press, NY, 135-161.
- Graybiel AM (1987): Functional neuroanatomy and neurochemistry of the basal ganglia. *Neurosci.Suppl.* 22: 669.
- Graybiel AM, Ragsdale CW (1979): Fiber connections of the basal ganglia. *Prog.Brain Res.* 51: 239-283.
- Graybiel AM, Ragsdale CW (1983): Biochemical anatomy of the striatum. In: *Chemical neuroanatomy* (PC Emson, ed.), Raven Press, NY, 427-504.

- Groenewegen HJ, van Dijk CA (1984): Efferent connections of the dorsal tegmental region in the rat studied by means of anterograde transport of the lectin phaseolus vulgaris leucoagglutinine PVLA. Brain Res. 304: 367-371.
- Grofova I (1975): The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. Brain Res. 91: 286-291.
- Grofova I, Deniau JM, Kitai ST (1982a): Morphology of the substantia nigra pars reticulata projection neurons intracellularly labeled with HRP. J.comp.Neurol. 208: 352-368.
- Grofova I, Deniau JM, Kitai ST, Donoghue JP (1982b): Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. Exp.Brain Res. 47: 105
- Grofova I, Rinvik E (1970): An experimental electron microscopic study on the striatonigral projection in the cat. Exp.Brain Res. 11: 249-262.
- Groves PM, Wilson CJ, Young SJ, Rebec GV (1975): Self-inhibition by dopaminergic neurons. Science 190: 522-529.
- Grube D (1980): Immunoreactivities of gastrin (G-)cells. II. Non-specific binding of immunoglobulins to G-cells by ionic interactions. Histochemistry 66: 149-167.
- Guesdon J-L, Ternynck T, Avrameas S (1979): The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J.Histochem.Cytochem. 27: 1131-1139.
- Hajdu F, Hassler R, Bak IJ (1973): Electron microscopic study of the substantia nigra and the strio-nigral projection in the rat. Z.Zellforsch. 146: 207-221.
- Hassler R (1938): Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postencephalitischen Parkinsonismus. J.Psychol.Neurol. 48: 443-476.
- Hayat MA (1986): Glutaraldehyde: Role in electron microscopy. Micron Microsc.Acta 17: 115-135.
- Herrera-Marschitz M, Christensson-Nylander I, Sharp T, Staines W, Reid M, Hökfelt T, Terenius L, Ungerstedt U (1986): Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat. II.Functional analysis. Exp.Brain Res. 64: 193-207.
- Hodgson AJ, Penke B, Erdei A, Chubb IW, Somogyi P (1985): Antisera to γ -aminobutyric acid. I.Production and characterization using a new model system. J.Histochem.Cyto-

chem. 33: 229-239.

- Hökfelt T, Millhorn D, Seroogy K, Tsuruo Y, Ceccatelli S, Lindh B, Meister B, Melander T, Schalling M, Bartfai T, Terenius L (1987): Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia* 43: 768-780.
- Hökfelt T, Dahlström A (1971): Effects of two mitosis inhibitors (Colchicine and Vinblastine) on the distribution and axonal transport of noradrenaline storage particles, studied by fluorescence and electron microscopy. *Z.Zellforsch.* 119: 460-482.
- Hommer DW, Pert A (1983): The actions of opiates in the rat substantia nigra: An electrophysiological analysis. *Peptides* 4: 603-608.
- Hong SJ, Yang HTT, Racagni G, Costa E (1977): Projections of substance P containing neurons from neostriatum to substantia nigra. *Brain Res.* 122: 541-544.
- Hopkins DA, Niessen LW (1976): Substantia nigra projections to the reticular formation, superior colliculus and central grey in the rat, cat and monkey. *Neurosci.Lett.* 2: 253-259.
- Horisberger M, Rosset J (1977): Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J.Histochem.Cytochem.* 25: 295-305.
- Hornykiewicz O (1963): Die topische Lokalisation und das Verhalten von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) in der Substantia nigra des normalen und Parkinson-kranken Menschen. *Wien.klin.Wschr.* 75: 309-312.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981a): Use of Avidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Cytochem.* 29: 577-580.
- Jessel T, Emson PC, Paxinos G, Cuello AC (1978): Topographic projections of substance P and GABA pathways in the striato- and pallidonigral system: A biochemical and immunohistochemical study. *Brain Res.* 152: 487-498.
- Johnson TN, Clementi CD (1959): An experimental study of the fiber connections between the putamen, globus pallidus, ventral thalamus, and midbrain tegmentum in cat. *J.comp.Neurol.* 113: 83-97.
- Johnston GAR, Curtis DR, de Groat WC, Duggan AW (1968): Central actions of ibotenic acid and muscimol. *Biochem. Pharmacol.* 17: 2488-2489.
- Joyce EM, Iversen SD (1979): The effect of morphine applied

- locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat. *Neurosci.Lett.* 14: 207-212.
- Juraska JM, Wilson CJ, Groves PM (1977): Substantia nigra of the rat. A golgi study. *J.comp.Neurol.* 172: 585-600.
- Kanazawa I, Emson CP, Cuello AC (1977): Evidence for the existence of substance P-containing fibers in striato-nigral and pallidonigral pathways in the rat brain. *Brain Res.* 119: 447-453.
- Karnovsky MJ (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J.Cell.Biol.* 27: 137A-138A.
- Kataoka K, Bak IJ, Hassler R, Kim JS, Wagner A (1974): L-glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase activity in the substantia nigra and the striatum after surgical interruption of the strionigral fibers of the baboon. *Exp.Brain Res.* 19: 217-227.
- Khachaturian H, Lewis ME, Haber S, Akil H, Watson SJ (1985): Prodynorphin peptide immunocytochemistry in the rhesus monkey brain. *Peptides* 6: 155-166.
- Khachaturian H, Watson SJ, Lewis ME, Coy D, Goldstein A, Akil H (1982): Dynorphin immunocytochemistry in the rat central nervous system. *Peptides* 3: 941-954.
- Kilpatrick IC, Collingridge G, Starr M (1982): Evidence for the participation of nigrotectal gammaaminobutyrate containing neurons in striatal and nigral-derived circling in the rat. *Neurosci.* 7: 207-222.
- Kilpatrick IC, Starr MS (1981): The nucleus tegmenti pedunculopontinus and circling behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 26: 11-16.
- Kim JS, Bak IJ, Hassler R, Okada Y (1971): Role of γ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. 2. Some evidence for the existence of a type of GABA-rich strio-nigral neurons. *Exp.Brain Res.* 14: 95-104.
- Köhler C, Schwarcz R (1983): Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: a histological study. *Neuroscience* 8: 819-835.
- König JFR, Klippel RA (1963): The rat brain: A stereotactic atlas. Krieger, New York.
- Krogsgaard-Larsen P (1978): GABA agonists and uptake inhibitors of restricted conformations: Structure-activity relations. In: *Amino acids as chemical transmitters* (Fonnum F, ed.), Plenum Press, New York: 305-321.

- Lackie PM, Hennessy RJ, Hacker GW, Polak JM (1985): Investigation of immunogold-silver staining by electron microscopy. *Histochemistry* 83: 545-550.
- Lavin A, Garcia-Munoz M (1985): Electrophysiological changes in substantia nigra after dynorphin administration. *Brain Res.* 369: 298-302.
- Legay F, Lecestre D, Tappaz M (1987a): Taurine biosynthesis in rat brain in vivo: Lack of relationship with cysteine sulfinic acid decarboxylase glutamate decarboxylase-associated activity (GAD/CSD II). *J. Neurochem.* 48: 340-344.
- Legay F, Weise VK, Oertel WH, Tappaz M (1987b): Taurine biosynthesis in rat brain: A new specific and sensitive microassay of cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSD I) activity through selective immunotrapping and its use for distribution studies. *J. Neurochem.* 48: 345-351.
- Lewis ME, Khachaturian H, Schäfer MKH, Watson SJ (1986). Anatomical approaches to the study of neuropeptides and related mRNA in the central nervous system. In: *Neuropeptides in neurologic and psychiatric disease* (JB Martin, JD Barches, eds.), Raven Press, New York, 79-109.
- Li S, Sivam SP, Hong JS (1986): Regulation of the concentration of dynorphin A 1-8 in the striatonigral pathway by the dopaminergic system. *Brain Res.* 398: 390-392.
- Lillie RD, Pizzolato P (1972): Histochemical use of borohydrides as aldehyde blocking reagents. *Stain Technol.* 47: 13-16.
- Lindvall O, Björklund A, Moore RY, Stenevi U (1974): Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Res.* 81: 325-331.
- Ljungdahl A, Hökfelt T, Nilsson G, Goldstein M (1978a): Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. II. Light microscopic localization in relation to catecholamine containing neurons. *Neurosci.Lett.* 3: 945-976.
- Ljungdahl A, Hökfelt T, Nilsson G (1978b): Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neurosci.* 3: 861-943.
- Llorens-Cortes C, Pollard H, Schwartz JC (1979): Localization of opiate receptors in substantia nigra: Evidence by lesion studies. *Neurosci.Lett.* 12: 165-170.
- London Resin Company Limited (1985): Using LR White for electron microscopy.

- Loopuijt LD, Sebens JB, Korf J (1987): A mosaic-like distribution of dopamine receptors in rat neostriatum and its relationship to striosomes. *Brain Res.* 405: 405-408.
- Loughlin SE, Fallon JH (1982): Mesostriatal projections from ventral tegmentum and dorsal raphe: cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally. *Neurosci.Lett.* 32: 11-16.
- McGinty JF, Gerfen CR, Young WS, McLean S (1987): Apomorphine upregulates dynorphin and substance P synthesis in striatal patch neurons: An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neurosci.Suppl.* 22: 801.
- Mugnaini E, Oertel WH (1985): An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD-immunocytochemistry. In: *Handbook of chemical neuroanatomy, Vol.4: GABA and neuropeptides in the CNS, part I* (A Björklund, T Hökfelt, eds.) Elsevier Amsterdam: 436-608.
- Nagai T, McGeer PL, McGeer EG (1983): Distribution of GABA-T intensive neurons in the rat forebrain and mid-brain. *J.comp.Neurol.* 218: 220-238.
- Nagy JI, Vincent SR, Lehmann J, Fibiger HC, McGeer EG (1978a): The use of kainic acid in the localization of enzymes in the substantia nigra. *Brain Res.* 149: 431-441.
- Naritoku WY, Taylor CR (1982): A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods: An evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase. *J.Histochem.Cytochem.* 30: 253-260.
- Nauta HWJ (1979): Projections of the pallidal complex: An autoradiographic study in the cat. *Neurosci.* 4: 1853-1873.
- Newman GR, Jasani B (1984): Post-embedding immunoenzyme techniques. In: *Immunolabeling for electron microscopy* (J.M.Polak, I.M.Varndell, eds.), Elsevier Science Publishers B.V.: 53-70.
- Nitsch C, Hubauer H, Riesenberger R (1985): Blood-brain barrier opening in rat hippocampus during seizures induced by intrastriatal kainate, and the role of the dynorphin-containing mossy fiber endings. *Int.Symp. "Excitatory amino acids and epilepsy", Fillerval (Paris).*
- Nitsch C, Mews K, Wagner A, Hassler R (1984): Effects of frontal motor cortex ablation on the ultrastructure of

- cat substantia nigra. *Acta anat.* 119: 193-202.
- Oertel WH, Mugnaini E, Schmechel DE, Tappaz ML, Kopin IJ (1982b): The immunocytochemical demonstration of gamma-aminobutyric acid-ergic neurons - Methods and application. In: *Cytochemical methods in neuroanatomy.* (V Chan-Palay, SL Palay, eds.), Alan R Liss Inc., New York: 297-329.
- Oertel WH, Riethmüller G, Mugnaini E, Schmechel DE, Weindl A, Gramsch C, Herz A (1983): Opioid peptide-like immunoreactivity in GABAergic neurons of rat neostriatum and central amygdaloid nucleus. *Life Sci.* 33: 73-76.
- Oertel WH, Schmechel DE, Tappaz ML, Kopin IJ (1981a): Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injection of an antigen-antibody complex. *Neuroscience* 6: 2689-2700.
- Oertel WH, Schmechel DE, Mugnaini E, Tappaz ML, Kopin IJ (1981c): Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum with a new antiserum. *Neuroscience* 6: 2715-2735.
- Oertel WH, Schmechel DE, Brownstein MJ, Tappaz ML, Ransom DH, Kopin IJ (1981d): Decrease of GAD-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra after kainic acid lesions of the striatum. *J.Histochem.Cytochem.* 29: 977-980.
- Oertel WH, Tappaz ML, Berod A, Mugnaini E (1982a): Two-color immunohistochemistry for dopamine and GABA neurons in the rat substantia nigra and zona incerta. *Brain Res.Bull.* 9: 463-474.
- Oka T, Negishi K, Kajiwara M, Watanabe Y, Ishizuka Y, Matsumiya T (1982): The choice of opiate receptor subtype by neo-endorphins. *Eur.J.Pharmacol.* 79: 301-305.
- Palkovits M, Brownstein MJ, Zamir N (1984): On the origin of dynorphin A and α -neo-endorphin in the substantia nigra. *Neuropeptides* 4: 193-199.
- Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A (1985): Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci.Meth.* 13: 139-143.
- Pelletier G, Morel G (1984): Immunoenzyme techniques at the electron microscopical level. In: *Immunolabeling for electron microscopy* (J.M.Polak, I.M.Varndell, eds.), Elsevier Science Publishers B.V.: 83-93.
- Phillipson OT, Pycock CJ (1982): Dopamine neurons of the ventral tegmentum project to both medial and lateral

- habenula. Exp. Brain Res. 45: 89-94.
- Pickel VM, Sumal KK, Beckley SC, Miller RJ, Reis DJ (1980): Immunocytochemical localization of enkephalin in the neostriatum of rat brain: A light and electron microscopic study. J.comp.Neurol. 189: 721-740.
- Piekut DT, Casey SM (1983): Penetration of immunoreagents in vibratome-sectioned brain: A light and electron microscope study. J.Histochem.Cytochem. 31: 669-674.
- Poirier LJ, Giguere M, Marchand R (1983): Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat. Brain Res.Bull. 11: 371-397.
- Pollard H, Llorens C, Schwartz JC (1977): Enkephalin receptors on dopaminergic neurons in rat striatum. Nature 268: 745-747.
- Precht W, Yoshida M (1971): Blockage of caudate-evoked inhibition of neurons in the substantia nigra by picrotoxin. Brain Res. 32: 229-233.
- Preston RJ, McCrea RA, Chang HT, Kitai ST (1981): Anatomy and physiology of substantia nigra and retrorubral neurons studied by extra- and intracellular recording and by horseradish peroxidase labeling. Neurosci. 6: 331-344.
- Pritzel M, Morgan S, Huston JP (1983): Interhemispheric nigrostriatal projections in the rat: bifurcating nigral projections and loci of crossing in the diencephalon. Brain Res.Bull. 10: 385-390.
- Quirion R, Gaudreau P, Martel J-C, St-Pierre S, Zamir N (1985): Possible interactions between dynorphin and dopaminergic systems in rat basal ganglia and substantia nigra. Brain Res. 331: 358-362.
- Reiner A (1986): The co-occurrence of substance P-like immunoreactivity in striatopallidal and striatonigral projection neurons in birds and reptiles. Brain Res. 371: 155-161.
- Reiner A, Brauth SE, Karten HJ (1984): Evolution of the amniote basal ganglia. Trends in Neurosci. 7: 320-325.
- Reubi J-C, Sandri C (1979): Ultrastructural observations on intercellular contacts of nigral dendrites. Neurosci. Lett. 13, 183-188.
- Ribak CE (1981): The GABAergic neurons of the extrapyramidal system as revealed by immunocytochemistry. In: GABA and the basal ganglia, (G DiChiara and GL Gessa, eds),

Raven Press, New York: 23-36.

- Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E (1980): GABAergic terminals decrease in the substantia nigra following hemitransections of the striatonigral and pallidonigral pathways. *Brain Res.* 192: 413-420.
- Ribak CE, Vaughn JE, Saito K (1978): Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 140: 315-332.
- Ribak CE, Vaughn J, Saito K, Barber R, Roberts E (1976): Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat substantia nigra. *Brain Res.* 116: 287-298.
- Riesenberger R, Palm VS, Gillen I, Nitsch C (1985): Immunocytochemical localization of zona pellucida antigens in ovaries of mouse, rat, and pig. 80.Vers.Anat.Ges., Abstr. S211.
- Rinvik E, Grofova I (1970): Observations on the fine structure of the substantia nigra in the cat. *Exp.Brain Res.* 11: 229-248.
- Robertson BC, Hommer DW, Skirboll LR (1987): Electrophysiological evidence for a non-opioid interaction between dynorphin and GABA in the substantia nigra of the rat. *Neurosci.* 23: 483-490.
- Rosegay H (1944): An experimental investigation of the connections between the corpus striatum and substantia nigra in the cat. *J.comp.Neurol.* 80: 293-321.
- Roth J, Bendayan M, Orci L (1978b): Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J.Histochem.Cytochem.* 26: 1074-1081.
- Scheel-Krüger J, Arnt JJ, Magelund G (1977): Behavioral stimulation induced by muscimol and other GABA agonists injected into the substantia nigra. *Neurosci.Lett.* 4: 351-356.
- Scheel-Krüger J, Magelund G (1981): GABA in the entopeduncular nucleus and the subthalamic nucleus participates in mediating dopaminergic striatal output functions. *Life Sci.* 29: 1555-1562.
- Schulz R, Wuster M, Herz A (1982): Endogenous ligands for kappa-opiate receptors. *Peptides* 3: 973-976.
- Schwarcz R, Köhler Ch, Fuxe K, Hökfelt T, Goldstein M (1979): On the mechanism of selective neuronal degeneration in the rat brain: Studies with ibotenic acid. In: *Advances in neurology, Huntingtons Chorea: 1972-1978*

(Chase TN, Wexler N, Barbeau A, eds.), Raven Press, New York: 655-668.

Schwyn RC, Fox CA (1973): The primate substantia nigra: A golgi and electron microscopic study. *J.f.Hirnforsch.* 15: 95-126.

Simon H, Le Moal M, Calas A (1979b): Efferents and afferents of the ventral tegmental-A10 region studied after local injection of 3H-leucine and horseradish peroxidase. *Brain Res.* 178: 17-40.

Simon H, Le Moal M, Stinus L, Calas A (1979a): Anatomical relationships between the ventral mesencephalic tegmentum-A10 region and the locus coeruleus as demonstrated by anterograde and retrograde tracing techniques. *J.Neural Trans.* 44: 77-86.

Soemmerring ST (1791): *Hirnlehre und Nervenlehre*, Frankfurt, Varrentrapp.

Somogyi P, Bolam JP, Totterdell S, Smith AD (1981): Monosynaptic input from the nucleus accumbens-ventral striatum region to retrogradely labelled nigrostriatal neurones. *Brain Res.* 217: 245-263.

Somogyi P, Hodgson AJ, Chubb IW, Penke B, Erdei A (1985): Antisera to γ -aminobutyric acid. II. Immunocytochemical application to the central nervous system. *J.Histochem. Cytochem.* 33: 240-248.

Somogyi P, Priestley JV, Cuello AC, Smith AD, Bolam JP (1982): Synaptic connections of substance P-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra of the rat. *Cell.Tiss.Res.* 223: 469-486.

Somogyi P, Smith AD (1979): Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra. Application of a combined Golgi staining and horseradish peroxidase transport procedure at both light and electron microscopic levels. *Brain Res.* 178: 3-15.

Staines WA, Nagy JI, Vincent SR, Fibiger HC (1980): Neurotransmitters contained in the efferents of the striatum. *Brain Res.* 194: 391-402.

Steindler DA, Deniau JM (1980): Anatomical evidence for collateral branching of substantia nigra neurons: a combined horseradish peroxidase and wheat germ agglutinin axonal transport. *Brain Res.* 196: 228-236.

Sternberger LA (1979): *Immunocytochemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York.

Streefkerk JG (1972): Inhibition of erythrocyte pseudoper-

- oxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J.Histochem.Cytochem.* 20: 829-831.
- Swaab DF, Pool CW, van Leeuwen FW (1977): Can specificity ever be proved in immunocytochemical staining? *J.Histochem.Cytochem.* 25: 388-390.
- Swanson LW (1982): The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res.Bull.* 9: 321-353.
- Taqet H, Javoy-Agid F, Giraud P, Legrand JC, Agid Y, Ges-selin F (1985): Dynorphin levels in parkinsonian patients: Leu5-enkephalin production from either proenkephalin A or prodynorphin in human brain. *Brain Res.* 341: 390-392.
- Totterdell S, Bolam JP, Smith AD (1984): Characterization of pallidonigral neurons in the rat by a combination of Golgi impregnation and retrograde transport of horseradish peroxidase: their monosynaptic input from the neostriatum. *J.Neurocytol.* 13: 593-616.
- Ueki A, Uno M, Anderson ME, Yoshida M (1977): Monosynaptic inhibition of thalamic neurons produced by stimulation of the substantia nigra. *Experientia* 33: 1480-1482.
- Van den Pol AN, Smith AD, Powell JF (1985): GABA axons in synaptic contact with dopamine neurons in the substantia nigra: Double immunocytochemistry with biotin-peroxidase and protein A-colloidal gold. *Brain Res.* 348: 146-154.
- Van der Kooy D, Coscina DV, Hattori T (1981): Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway? *Neurosci.* 6: 345-357.
- Van der Kooy D, Weinreich P, Nagy JI (1986): Dopamine and opiate receptors: Localization in the striatum and evidence for their axoplasmic transport in the nigrostriatal and striatonigral pathways. *Neurosci.* 19: 139-146.
- Van Leeuwen F (1986): Pitfalls in immunocytochemistry with special reference to the specificity problems in the localization of neuropeptides. *Am.J.Anat.* 175: 363-377.
- Venable JH, Coggeshall R (1965): A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J.Cell Biol.* 25: 407-408.
- Vicq d'Azyr F (1786): *Traité d'anatomie et de physiologie*, Paris.
- Vincent SR, Hökfelt T, Christensson I, Terenius L (1982a): Immunohistochemical evidence for a dynorphin-immunoreac-

- tive striato-nigral pathway. *Europ.J.Pharmacol.* 85: 251-252.
- Vincent SR, Hökfelt T, Christensson I, Terenius L (1982b): Dynorphin-immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat. *Neurosci.Lett.* 33: 185-190.
- Vogt C, Vogt O (1920): Zur Lehre der Erkrankungen des striären Systems. *J.Psychol.u.Neur.* 25, Erg.-H. 3.
- Walker JM, Friederich MW (1985): Electrophysiological and behavioral actions of dynorphin in the substantia nigra. *Soc.Neurosci.Abstr.* 11: 1163.
- Wassef M, Berod A, Sotelo C (1981): Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neurosci.* 6: 2125-2139.
- Watson SJ, Khachaturian H, Akil H, Coy D, Goldstein A (1982): Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain. *Science* 218: 1134-1136.
- Weir EE, Pretlow TG, Pitts A, Williams EE (1974): A more sensitive and specific histochemical peroxidase stain for the localization of cellular antigen by the enzyme-antibody conjugate method. *J.Histochem.Cytochem.* 22: 1135-1140.
- Whitnall MH, Castell M, Key S, Gainer H (1985): Immunocytochemical identification of dynorphin-containing vesicles in brattleboro rats. *Peptides* 6: 241-247.
- Williams MN, Faull RLM (1985): The striatonigral projection and nigrotectal neurons in the rat. A correlated light and electron microscopic study demonstrating a monosynaptic striatal input to identified nigrotectal neurons using a combined degeneration and horseradish peroxidase procedure. *Neurosci.* 14: 991-1010.
- Wilson CJ, Groves PM, Fifkova E (1977): Monoaminergic synapses, including dendro-dendritic synapses in the rat substantia nigra. *Exp.Brain Res.* 30: 161-174.
- Wood GS, Warnke R (1981): Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J.Histochem.Cytochem.* 29: 1196-1204.
- Yoshida M, Precht W (1971): Monosynaptic inhibition of neurons of the substantia nigra by caudato-nigral fibers. *Brain Res.* 32: 225-228.

Zamir N, Palkovits M, Weber E, Mezey E, Brownstein MJ
(1984): A dynorphinergic pathway of leu-enkephalin production in rat substantia nigra. Nature 307: 643-645.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1984 bis 1987 in der Abteilung Neuroanatomie (Lehrstuhl III) der Anatomischen Anstalt in München durchgeführt. Herr Prof.Dr.med.W. Lange stellte dankenswerterweise Arbeitsplatz und Gerätschaften zur Verfügung.

Herrn PD Dr.D.Weiss danke ich für die Betreuung der Arbeit, Herrn cand.med. Frank Schäfer für die tatkräftige Unterstützung bei den Operationen. Herrn PD Dr.med.W.H.Oertel und Herrn Prof.Dr.med.A.Herz danke ich für die Bereitstellung des GAD- bzw. Dynorphin-Antiserums.

Die großzügigen Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 220 werden dankbar anerkannt.

Mein ganz besonderer persönlicher Dank gilt Frau PD Dr. med.C.Nitsch. Das von ihr initiierte und geleitete Teilprojekt C5 des SFB 220 hat diese Arbeit erst ermöglicht. Ich danke Frau Nitsch für die uneingeschränkte Unterstützung und Förderung, für anregende Diskussionen, ihr vorbildliches Engagement und nicht zuletzt für das angenehme, freundschaftliche Arbeitsklima.

LEBENS LAUF

Name: Rainer Riesenberg
Eltern: Luise und August Riesenberg
Geburtsdatum: 1. Juni 1950 in Herford
Familienstand: Verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung: 1956-1961 Grundschule in Bielefeld
1961-1966 Realschule in Bielefeld

Berufstätigkeit: 1967-1975 Ausbildung und Tätigkeit als
Biologielaborant, ASTA-Werke, 4800 Bielefeld 14,
unterbrochen durch den Grundwehrdienst 1.4.1971-30.9.1972

Schulbildung: 1973-1976 Abendgymnasium Bielefeld

Studium: Biologie 1977-1983
Ludwig-Maximilians-Universität München

Diplom: 20. Januar 1984
Fächerkombination: Zoologie, Anthropologie und Humangenetik, med. Physiologie

Berufstätigkeit: ab Oktober 1983 zunächst studentische,
dann wissenschaftliche Hilfskraft, seit Mai 1985 wissenschaftlicher Mitarbeiter
im Teilprojekt C5 des SFB 220 an der Anatomischen Anstalt München. Neben dieser
Tätigkeit wurde die Dissertation im gleichen Labor angefertigt.

